



HAL
open science

Test d'efficacité thérapeutique des associations Artésunate-amodiaquine et Artéméther-luméfantrine et polymorphisme du gène pfcr1 à Massakory (République du Tchad)

Hassane Taïssou Mahamat Moussa

► **To cite this version:**

Hassane Taïssou Mahamat Moussa. Test d'efficacité thérapeutique des associations Artésunate-amodiaquine et Artéméther-luméfantrine et polymorphisme du gène pfcr1 à Massakory (République du Tchad). Sciences du Vivant [q-bio]. Université Félix Houphouët Boigny Abidjan (Côte d'Ivoire), 2021. Français. NNT: . tel-04178337

HAL Id: tel-04178337

<https://hal.science/tel-04178337>

Submitted on 7 Aug 2023

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

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



REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
Union-Discipline-Travail

Ministère de l'Enseignement supérieur
et de la Recherche Scientifique



Année Universitaire
2020-2021

THÈSE

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

SPÉCIALITÉ : BIOLOGIE HUMAINE

OPTION : PARASITOLOGIE

Numéro d'ordre
79

M. MAHAMAT MOUSSA Hassane Taïssou

Test d'Éfficacité Thérapeutique des associations
Artésunate-amodiaquine et Artéméther-luméfantrine et
polymorphisme du gène *pfcr1* à Massakory
(République du Tchad)

Soutenu publiquement
Le 22 Décembre 2021

Composition du jury

Mme DOSSO Mireille	: Professeur Titulaire	UFHB/UFR-SMA	Président
M. DJAMAN Allico Joseph	: Professeur Titulaire	UFHB/UFR-BioS	Directeur
M. TOURE André Offianan	: Maître de Recherche	IPCI	Co-Directeur
Mme KONATE TOURE Abibatou	: Maitre de Conférences Agrégé	UFHB/UFR-SPB	Rapporteur
M. BLA Kouakou Brice	: Maitre de Conférences	UFHB/UFR-BioS	Rapporteur
M. THIAM Assane	: Maitre de Conférences Agrégé	UFHB/UFR-OS	Examineur



AVANT-PROPOS

AVANT-PROPOS

L'OMS recommande à tous les pays de surveiller régulièrement l'émergence ou la diffusion des parasites résistants. 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 des isolats de *Plasmodium falciparum*, dans les pays d'endémies. En phase avec cette recommandation le PNLP du Tchad a inscrit dans ses activités, ces travaux portant sur l'étude de l'efficacité thérapeutique des combinaisons thérapeutiques à base de dérivés d'artémisine (CTAs) utilisées dans les formations sanitaires. Depuis l'introduction officielle des CTAs en 2005 au Tchad après le retrait de la chloroquine, très peu d'études ont été réalisées surtout sur les marqueurs moléculaires de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques notamment le *pfcr*. L'objectif de cette étude est d'une part d'évaluer l'efficacité thérapeutique de l'ASAQ et de l'AL dans le traitement du paludisme non compliqué à *P. falciparum* dans le district sanitaire de Massakory District Sanitaire Provincial (DSP) de Hadjer-Lamis et d'autre part de déterminer le polymorphisme du gène *pfcr*.

Les travaux se sont déroulés au centre de santé de Massakory pour les tests d'efficacité thérapeutiques du 14 décembre 2019 au 14 mars 2020 et à l'Institut Pasteur de Côté-d'Ivoire (IPCI) pour l'étude du gène *pfcr* du 01 avril au 01 août 2021. Les échantillons de sang ont été prélevés puis déposés sur papier Whatman, séchés et conservés à températures ambiante avant d'être envoyés à l'IPCI pour la réalisation des analyses moléculaires (PCR) à la plate-forme de Biologie moléculaire. Les quatre-vingt (80) échantillons d'amplicons ont été séquencés à la plate-forme au Centre de Recherche du CHU de Québec.

Les travaux de terrain à Massakory et les analyses des échantillons à l'IPCI ont été pris en charge par le Ministère de la Santé Publique du Tchad.

Le Tchad a signé en date du 31 janvier 2012 et a ratifié le 11 octobre 2017 le protocole de Nagoya sur l'accès aux ressources génétiques et le partage juste et équitable des avantages découlant de leur utilisation relative à la convention sur la diversité biologique.

DÉDICACES

**À
ALLAH
Le Miséricordieux !
Que Son Saint Nom Soit Exalté.**

A mon père, **Mr Moussa HASSANE TAÏSSO**, reçois ici ma plus grande reconnaissance, ce travail n'est que l'aboutissement de l'éducation que j'ai reçu de toi; saches que je suivrai tes conseils comme toujours. Que Dieu t'accorde longue vie.

A ma mère, **Mme Khadîdja DABA MANDEBLE**, Tu as toujours su nous apporter amour et tendresse. Tes prières ont toujours été l'arme de ma réussite. Que Dieu te garde et te donne une longue vie chère mère.

REMERCIEMENTS

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 a donné toute sa vie pour faire de cet institut un pôle africain de référence en matière de recherches scientifique et biomédicale. Merci pour m'avoir permis de poursuivre la réalisation de mes rêves dans la vie scientifique et surtout d'avoir approuvé mon stage de thèse au sein de cette illustre institution de recherche dont vous dirigez. Que le bon Dieu vous accompagne dans votre vie de chaque jour, qu'il vous comble de sa riche bénédiction.

A notre Maître et Directeur de thèse

M. DJAMAN Allico Joseph, Professeur Titulaire de Biochimie-Parasitologie, Directeur de l'UPR 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. Cher Maître, qu'il nous soit permis ici de vous témoigner toute ma reconnaissance de m'avoir accepté comme thésard. Vos qualités sont admirables. Votre amour pour le travail bien fait, votre disponibilité et votre courtoisie nous ont toujours impressionnés. Que le bon Dieu vous accorde sa riche bénédiction et sa protection divine.

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, nous avons été impressionnés par votre dynamisme et votre aptitude à transmettre le savoir. La disponibilité et l'attention que vous avez envers les étudiants sont les forces qui nous ont permis de réaliser ce travail. Très touché par votre simplicité et votre gentillesse avec laquelle vous nous avez toujours reçu, permettez-nous de vous dire tout simplement : Merci. Que le Seigneur vous accorde ses abondantes bénédictions!

A notre maître et membre du jury

M. BLA Kouakou Brice, Maître de Conférences, UFR Biosciences de l'Université Félix Houphouët Boigny de Côte d'Ivoire. 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 maitre et membre du jury

Mme KONATE Touré Abibatou, Maître de Conférences Agrégé de Parasitologie-Mycologie, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Félix Houphouët Boigny de Côte d'Ivoire. Chère maitre, 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.

A notre maitre et membre du jury

M. THIAM Assane, Maître de Conférences Agrégé, 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 Maître, l'expression de notre profonde reconnaissance.

- **M. Issa Mahamat Souleymane**, Docteur de l'Université Félix Houphouët Boigny de Côte d'Ivoire en Biologie Humaine Tropicale option Parasitologie, Directeur des Laboratoires Nationales du Ministère de la Santé Publique et de la Solidarité Nationale. Coordonnateur de l'étude. L'occasion m'est offerte pour témoigner de ta générosité car tu t'es impliqué pour cette thèse du début jusqu'à sa réalisation. Sois béni par le très Haut, cher ami.
- **M. Hamit Mahamat Alio**, Maître de Conférences CAMES, Chef de Département Sciences Biomédicales de la Faculté des Sciences et de la Santé Humaine de l'Université de N'Djaména, superviseur de l'étude. Mon tonton comme je t'appelle toujours tu m'as toujours encouragé à aller de l'avant. C'est l'occasion pour moi ici de t'exprimer ma profonde reconnaissance, et que Dieu te comble de sa riche bénédiction.
- **M. DJIMADOUM Mbang**, Médecin, Enseignant-Chercheur, Assistant à la Faculté des Sciences de la Santé Humaine (FSSH) à l'Université de N'Djaména, ce travail a consolidé nos relations. Votre sens d'écoute et d'ouverture est une chose remarquable. Que le bon Dieu vous protège et vous accorde une longue vie. Recevez ma profonde gratitude.
- **M. RINGWALD Pascal**, Médecin-chercheur à l'OMS/Genève, Trouvez en ce travail l'expression de ma profonde gratitude, puisse le Seigneur veiller sur vous et sur votre famille !
- **M. DJMRASSENGAR Honoré**, Médecin au bureau de l'OMS/Tchad ; je vous remercie pour la collaboration pendant la réalisation de cette étude et les voyages de terrain. Trouvez ici l'expression de ma gratitude. Que le Seigneur vous accorde ses abondantes bénédictions.
- **M. Mahamat Saleh Issakha Diarr**, Médecin, Coordonnateur du PNLP Tchad ; je suis entièrement reconnaissant de votre acte et l'intérêt particulier que vous avez accordé à cette étude. Vous aviez accepté ma participation dans cette grande activité du PNLP que vous pilotiez; Que DIEU vous accorde sa grande faveur et vous bénisse richement.
- **M. Djidi Ali Sougoudi**, Médecin infectiologue, Secrétaire d'État du Ministère de la Santé et de la Solidarité Nationale ; Vous aviez approuvé ma demande de participation dans cette étude en m'accordant cette grande possibilité, ce travail est aussi le vôtre. Soyez-en remerciez infiniment, que le Tout Puissant vous accorde sa protection.
- **M. Brahim BOY OTCHOM**, Professeur en Biochimie, nous vous sommes très reconnaissants, de nous avoir initié dans la vie de recherche et d'avoir accepté de nous suivre dans la réalisation de plusieurs de nos travaux au pays. Que Dieu vous bénisse.

- Aux Professeurs **Comlan Aristide de SOUZA**, **Bourahima Sopho BOUKARI**, feu **Koué FOLLIGAN**, **Mounerou SALOU**, **AMEYAPOH Yaovi** de l'Université de Lomé, soyez remerciés pour les connaissances transmises lors de nos études effectuées à l'Université de Lomé- TOGO.
- **A la grande famille de la Faculté des Sciences de la Santé Humaine** de l'Université de N'Djaména, il s'agit de : **M. Foumsou Lhadagadang**, Professeur titulaire en Gynécologie-Obstétrique, Doyen ; **Mme Antoinette Djekoundade**, Medecin, Vice-Doyenne ; **M. Abdelsalam Tidjani**, Professeur titulaire, Chef de departement de Santé Publique ; **M. Djimodal Tedebaye**, Chef de service de la scolarité ; **Mme Ballah née Naradoum Ngaradoubaye**, secrétaire du Doyen ; **M. Ali Mahamat Moussa**, Professeur titulaire ; et tous ceux dont je n'ai pu citer, recevez ma profonde gratitude pour la chaleur professionnelle et les encouragements de chaque jour envers ma personne. Soyez richement bénis par le bon Dieu Tout Puissant.
- **Dr BEOUROU Sylvain**, Maître de recherche, chef de l'Unité de Paludologie. Merci pour votre ouverture, votre disponibilité et vos conseils tout au long des moments passé au sein de cet institut.
- **Dr VANGA**, Maître de Conférences Agrégée, chef de l'Unité de Parasitologie et **Dr BONOUMIN Ira**, Chargé de recherche, chef de l'Unité de Mycologie à l'Institut Pasteur Côte d'Ivoire pour leur contribution à ce travail scientifique.
- **Dr AKO Ako Bérenger**, Chargé de recherche, chercheur à l'Unité de Paludologie à l'Institut Pasteur Côte d'Ivoire. Je vous remercie de m'avoir accueilli et accompagné à surmonter les difficultés dans la réalisation de ce travail, trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude. Que le bon Dieu vous accorde sa bénédiction.
- **Dr KOFFI David**, Chargé de recherche, chercheur à l'Unité de Mycologie, **Dr TUO Karim**, Chargé de recherche, chercheur à l'Unité de Parasitologie, **Dr N'GUESSAN Tiacoh Landry**, Médecin, attaché de recherche à l'Unité de Réception d'Accueil et de Prestation (URAP) et à l'Unité de Parasitologie, **Dr YAO Serges Stéphane**, Attaché de recherche à l'Unité de Paludologie de l'Institut Pasteur Côte d'Ivoire, merci pour votre aide de toute nature et surtout votre disponibilité chaque fois que j'ai eu à vous solliciter. Vous m'aviez fait sentir aussi chez moi. Que le bon Dieu vous accorde ses faveurs immenses.
- **Dr KAKOU N'gazoua Solange**, Maître de Recherche, responsable de la Plateforme de Biologie Moléculaire de l'Institut Pasteur Côte d'Ivoire ainsi qu'à toute son équipe : **M. Yavo**, **M. Sylla Aboubacar**, **Mme Flanny**, **Mme Mambé**, soyez ici remerciés d'avoir permis que je fasse la plus grande partie de mes travaux au sein de votre Plateforme, dans

de très bonnes conditions. Je prie le bon Dieu de vous assister tout le long de votre vie. Recevez l'expression de ma profonde gratitude.

- **M. KOUDOU Aristide, Karidja, Bakayoko, Apia, Ange** et tous les autres collocateurs de la Guest House de Adiopodoumé, recevez ici le témoignage de ma gratitude pour tous les moments passés ensemble ; vous aviez rendu agréable mon séjour. Fraternellement soyez richement béni. Brillante carrière à vous tous.
- Les doctorants **TANGUY NDOCHO Fiacre, GNONDJUI Albert, , ATTOUNGBRE Clément, KOUADIO N'Dri Borel, BIALE Marina, DIBI Saint-Didier, AKA N'Tayé, KOUADJO Francis, Yéo Issa, M'BOH Reine, EFFOH, AKA Delpêche**, recevez ici ma profonde gratitude pour tous les moments partagés ensemble. Fraternellement que le bon Dieu vous accorde son immense bonté et sa miséricorde pour que vous réussissiez votre vie.
- Messieurs **KOUMAN Angelo** et **KOUI Stéphane**, doctorants à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire ; vous avez été des coachs techniques 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. Recevez ici ma profonde gratitude et je vous souhaite une brillante carrière.
- A mon oncle, Professeur **Mackaye Hassane Taïssou**, merci pour ta bienveillante présence chaque jour de ma vie et pendant tout mon parcours, que le bon Dieu te comble de sa riche bénédiction.
- A mes frères et sœurs : Dr. **Haoua, Maïmouna, Salila, Dr. Hassane, Mackaye, Daba, Seïdé, Sadia, Djégué, Moctar** ; Merci pour votre tendresse et affection pour moi, ce travail est le plus beau cadeau que je vous offre, que Dieu nous bénisse d'avantage et qu'il nous protège pour demeurer toujours unis.
- A la grande famille **HASSANE TAÏSSO**, Ce travail est le vôtre. Votre affection a été la joie pour moi d'appartenir à une grande famille. Dieu vous comble de sa grâce. Merci pour cette chaleur familiale.
- A mes tantes et oncles : **Amsoubiane H., Seïdé H., Khadidja G., Youssouf H., Hassan D., Brahim D., Haoua D., Sandra M.** et tous ceux dont je n'ai pu citer.
- Pour votre compréhension, tendresse et amour, je vous dédie ce travail. Que Dieu vous bénisse.
- Aux familles : **ISSA DANNAO Annour, GABI Mahamat, SIDJIM Saleh, ADOUM GOUDJA Brahim, DABA MANDEBLE, ALI RIASS, et toute la famille BIDIO.** Ce

travail témoigne votre soutien envers moi et envers ma famille. Je vous remercie très sincèrement.

- A mon ami et frère **Dr Abakar Mahamat Hassaballah**, Directeur des Examens et Concours à l'Office National des Examens et Concours du Supérieur (ONECS) du Tchad ; 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 mon épouse **Maïmouna Mahamat Abdoulaye**, reçois à travers cette ligne ma profonde gratitude et mon témoignage de ta patience devant les difficultés que nous eûmes à traverser ensemble. Que Dieu nous accorde sa bonté et sa miséricorde dans notre quotidien.
- A **Mr Hassan Ahmat Mihedi**, Agent Comptable du PNLP et tout le personnel du Programme National de Lutte contre le Paludisme
- A tout le personnel du Centre de District de Massakory 1
- A mes compatriotes étudiants tchadiens à Abidjan,
- 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 !

TABLE DES MATIERES	PAGES
AVANT-PROPOS _____	I
DÉDICACES _____	III
REMERCIEMENTS _____	VI
LISTE DES ABREVIATIONS _____	XVIII
LISTE DES FIGURES _____	XX
LISTE DES TABLEAUX _____	XXI
INTRODUCTION _____	1
I. GENERALITES _____	7
I.1. Épidémiologie _____	8
I.1.1. Agents pathogènes _____	8
I.1.1.1. Taxonomie _____	8
I.1.1.2. Espèces _____	8
I.1.2. Agent vecteur _____	10
I.2. Cycle évolutif de <i>Plasmodium</i> _____	11
I.2.1. Phase asexuée _____	11
I.2.1.1. Cycle hépatique _____	11
I.2.1.2. Cycle érythrocytaire _____	11
I.2.2. Phase sexuée chez l'anophèle _____	14
I.3. Répartition géographique du paludisme _____	14
I.3.1. Monde _____	14
I.3.2. Afrique _____	14
I.3.3. Tchad _____	17
I.4. Formes cliniques du paludisme _____	17
I.4.1. Paludisme simple _____	17
I.4.2. Paludisme grave _____	18
I.4.3. Paludisme des populations à risque _____	18
I.4.3.1. Paludisme de l'enfant _____	18
I.4.3.2. Paludisme de la femme enceinte _____	19
I.5. Diagnostic biologique du paludisme _____	19
I.5.1. Diagnostic direct _____	19
I.5.1.1. Goutte Épaisse _____	19
I.5.1.2. Frottis Sanguin _____	20
I.5.1.3. Tests de Diagnostic Rapide _____	20
I.5.1.4. Polymerase Chain Reaction _____	21

I.5.2. Diagnostic indirect	21
I.5.2.1. Enzyme linked immunosorbent assay	21
I.6. Principales familles d'antipaludiques et leurs utilisations	22
I.6.1. Famille des lysosomotropes	22
I.6.1.1. Dérivés de l'artémisinine	23
I.6.1.2. Amino-alcools	23
I.6.1.3. Amino-4-quinoléines	23
I.6.2. Famille des antimétabolites	24
I.6.3. Antibiotiques à activité antipaludique	25
I.6.4. Antipaludiques et grossesse	25
I.7. Directives nationales de traitement au Tchad	26
I.7.1. Traitement du paludisme simple	26
I.7.2. Traitement du paludisme grave	26
I.8. Modes d'action des antipaludiques et mécanismes de résistance des plasmodies	26
I.8.1. Chimiorésistance	26
I.8.2 Historique et situation actuelle de résistance	27
I.8.3. Amino-alcools	27
I.8.3.1. Quinine	27
I.8.3.1.1. Mode d'action	27
I.8.3.1.2. Mécanisme de résistance	28
I.8.3.2. Mefloquine	28
I.8.3.2.1. Mode d'action	28
I.8.3.2.2. Mécanisme de résistance	28
I.8.4. Amino-4-quinoléines	29
I.8.4.1. Chloroquine	29
I.8.4.1.1. Mode d'action	29
I.8.4.1.2. Mécanisme de résistance	29
I.8.4.2. Amodiaquine	32
I.8.4.2.1. Mode d'action	32
I.8.4.2.2. Mécanisme de résistance	32
I.8.5. Artémisinine et ses dérivés	32
I.8.5.1. Mode d'action	32
I.8.5.2. Mécanisme de résistance	32
I.8.6. Antimétabolites	33
I.8.6.1. Antifoliques	33

I.8.6.1.1. Mode d'action	33
I.8.6.1.2. Mécanismes de résistance	33
I.8.6.2. Antifoliniques	33
I.8.6.2.1. Mode d'action	33
I.8.6.2.2. Mécanisme de résistance	33
I.8.7. Hydroxynaphtoquinones (atovaquone)	34
I.8.7.1. Mode d'action	34
I.8.7.2. Mécanisme de résistance	34
I.8.8. Antibiotiques (Doxycycline)	34
I.8.8.1. Mode d'action	34
I.8.8.2. Mécanisme de résistance	34
I.9. Marqueurs moléculaires de résistance	35
I.10. Dynamique des résistances	37
I.10.1. Facteurs favorisant les chimiorésistances	37
I.10.1.1. Pression médicamenteuse et la sélection des mutants	37
I.10.1.2. Degré d'immunité de la population	38
I.10.1.3. Voyages	38
I.10.1.4. Anophèles Vecteurs	38
I.11. Méthodes d'évaluation des antipaludiques	38
I.11.1. Tests d'efficacité thérapeutique	39
I.11.2. Tests <i>ex-vivo</i>	40
I.11.3. Marqueurs moléculaires de résistance	41
II. MATERIEL ET METHODES	42
II.1. Matériel	43
II.1.1. Site de l'étude	43
II.1.2. Population de l'étude	43
II.1.2.1. Critères d'inclusion	45
II.1.2.2. Critères de non inclusion	45
II.1.3. Matériel biologique	46
II.1.4. Matériel technique et réactifs	46
II.1.4.1. Matériel et réactifs pour la microscopie	46
II.1.4.2. Matériel pour l'étude moléculaire	46
II.1.4.3 Réactifs et solutions pour l'étude moléculaire	47
II.2. Méthodes	47
II.2.1. Types et période d'étude	47

II.2.2. Taille de l'échantillon	47
II.2.3. Recrutement des patients	48
II.2.4. Procédures cliniques	48
II.2.4.1. Randomisation et administration du médicament	48
II.2.4.2 Critère majeur d'évaluation de l'efficacité des molécules administrées	51
II.2.4.3. Critères d'évaluation secondaire	51
II.2.5. Réalisation de la Goûtte Épaisse	51
II.2.6. Techniques de biologie moléculaire	52
II.2.6.1. Réalisation de confettis sanguins	52
II.2.6.2. Extraction de l'ADN au Kit Qiagen	54
II.2.6.3. Amplifications des gènes d'intérêt	56
II.2.6.3.1. Gènes étudiés	56
II.2.6.3.2. Préparation milieu réactionnel	56
II.2.6.3.3. Programmes d'amplification	56
II.2.6.3.4. Électrophorèse des produits d'amplification	58
II.2.6.3.5. Purification des amplicons	58
II.2.6.4. Séquençage du gène <i>pfcr</i>	59
II.2.6.5. Analyse des résultats de biologie moléculaire	59
II.2.6.5.1. Analyse des résultats de qPCR	59
II.2.6.5.2. Analyse des résultats d'amplification conventionnelle	59
II.2.6.5.3. Analyse des données de séquençage et identifications des mutations	59
II.2.7 Analyse statistique des données	60
II.2.8 . Considérations éthiques	60
III. RESULTATS	61
III.1. Test d'Efficacité Thérapeutique de l'ASAQ et de l'AL	62
III.1.1. Aspects épidémiologiques	62
III.1.1.1. Profil de la population	62
III.1.1.2. Caractéristique générale de la population d'étude	62
III.1.2. Efficacité clinique	66
III.1.3. Efficacité parasitologique	69
III.1.4. Réponse thérapeutique	72
III.1.5. Évaluation de la tolérance clinique	72
III.2. Caractérisation moléculaire du gène <i>pfcr</i>	75
III.2.1. Extraction et quantification de l'ADN	75
III.2.2. Amplification gène <i>pfcr</i>	75

III.2.4. Séquençage	77
IV. DISCUSSION	80
CONCLUSION & PERSPECTIVES	87
RECOMMANDATIONS	90
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	92
ANNEXES	107
PUBLICATIONS	111

LISTE DES ABREVIATIONS

- A : Alanine (Ala)
- ADN : Acide Désoxyribonucléique
- AL : Artéméther-Lumefantrine
- ARN : Acide RiboNucléique
- ASAQ : Artésunate-Amodiaquine
- C : Symbole de code de cystéine (Cys)
- CDC : Center for Disease Control and prevention
- CQ : chloroquine
- CQR : Chloroquino résistance
- CTA : Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine
- D : Symbole de code de l'acide aspartique (Asp)
- DSIS : Division de Système d'Information Sanitaire
- DV : Vacuole digestive
- E : Symbole de code de l'acide glutamique (Glu)
- ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay
- F : Symbole de code de la phénylalanine (Phe)
- FM : Frottis Mince
- FS : Frottis Sanguin
- G : Symbole de code de la glycine (Gly)
- GE : Goutte Epaisse
- GLURP : Glutamate Rich Protein
- H : Symbole de code de l'histidine (His)
- Hb : Hémoglobine
- HRP2 : Histidin Rich Protein 2
- I : Symbole de code de l'isoleucine (Ile)
- K : Symbole de code de la lysine (Lys)
- L : Symbole de code de la leucine (Leu)
- M : Symbole de code de la méthionine (Met)
- MII : Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide
- MSPSN: Ministère de la Santé Publique et de la Solidarité Nationale
- MSP1 : Mérozoite Surface Protein 1
- N : Symbole de code de l'asparagine (Asn)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé
P : Symbole de code de la proline (Pro)
PBS : solution saline tamponnée au phosphate
PCR : Polymerase Chain Reaction
Pf : *Plasmodium falciparum*
pfprt : transporteur de résistance à la chloroquine *Plasmodium falciparum*
pH : Potentiel d'Hydrogène
PLDH : *Plasmodium Lactate déshydrogénase*
Q : Symbole de code de la glutamine (Gln)
R : Symbole de code de l'arginine (Arg)
S : Symbole de code de la sérine (Ser)
SNPs : Single Nucleotide Polymorphisme
T : Symbole de code de la thréonine (Thr)
TDR : Test de Diagnostic Rapide
trs : Tours
TPI : Traitement Préventif Intermittent
V : Symbole de code de la valine (Val)
W : Symbole de code du tryptophane (Trp)
Y : Symbole de code de la tyrosine (Tyr)

LISTE DES FIGURES

Pages

Figure 1 : schema du cycle de developpement de <i>Plasmodium</i>	13
Figure 2 : distribution mondiale du paludisme	16
Figure 3 : representation schematique de <i>pfcr</i> t et des positions des mutations identifiées... 30	
Figure 4 : localisation du site de l'etude	44
Figure 5 : confettis de papier filtre Whatman 3 mm.....	53
Figure 6 : protocole d'extraction au Qiagen.....	55
Figure 7 : repartition des patients par groupe de traitement	63
Figure 8 : repartition des patients selon les tranches d'âge dans les deux groupes de traitement	65
Figure 9 : proportion des sujets apyretiques dans le groupe ASAQ.....	67
Figure 10 : proportion des sujets apyretiques dans le groupe AL	67
Figure 11 : évolution de la temperature moyenne	68
Figure 12 : repartition des patients selon les densités parasitaires et le type de traitement	70
Figure 13 : évolution du nombre de sujets sans parasitémie	71
Figure 14 : évolution de la densite parasitaire moyenne	71
Figure 15 : proportion des evenements indesirables.....	74
Figure 16 : profil electrophoretique du gène <i>pfcr</i> t.....	76
Figure 17 : frequence des mutations des codons du gène <i>pfcr</i> t des isolats de <i>P. falciparum</i> .	79

LISTE DES TABLEAUX

Pages

Tableau I	: Marqueurs moléculaires de résistance de <i>P.f.</i> selon les antipaludiques	___ 35
Tableau II	: Posologie des médicaments utilisés dans le suivi des participants	_____ 49
Tableau III	: Séquences des amorces utilisées	_____ 56
Tableau IV	: Programmes d'amplification	_____ 56
Tableau V	: Caractéristiques clinique et paraclinique de la population d'étude	_____ 63
Tableau VI	: Réponses au traitement à J28 en fonction des deux types de molécules	__ 71
Tableau VII	: Distribution des mutations pures du gène <i>pfcr</i>	_____ 76
Tableau VIII	: Prévalence des génotypes du gène <i>pfcr</i>	_____ 76

INTRODUCTION

Le paludisme constitue encore de nos jours un grave problème de santé publique malgré les acquis au cours de ces dix dernières années dans la lutte contre cette parasitose.

Selon le dernier rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) , en 2019, on estimait à 229 millions le nombre de cas de paludisme dans le monde avec un nombre estimé de décès s'élevant à 409 000 (OMS, 2019). La moitié des cas dans le monde ont été enregistrés dans 6 pays : Nigéria (23 %), République démocratique du Congo (11 %), République-Unie de Tanzanie (5 %), Burkina Faso (4 %), Mozambique et Niger (4 % chacun). Les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes constituent les populations les plus vulnérables en zone d'endémie palustre. Les décès survenus chez les enfants ont représenté 67 % de l'ensemble des décès (>274 000) (OMS, 2019). 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 rapide et efficace des cas par les Combinaisons Thérapeutiques à Base de dérivés d'Artemisinine (CTA) pour le paludisme simple par voie orale et l'artesunate, l'artémether et la quinine par voie parentérale pour le paludisme grave.

Les progrès enregistrés ces dernières années ont été possibles grâce à la combinaison de deux stratégies majeures notamment la prise en charge rapide et efficiente des cas par les CTA et la prévention par l'utilisation massive des Moustiquaires Imprégnées à Longue Durée d'Action (MILDA).

En effet depuis l'émergence et la propagation de la résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques usuels notamment la chloroquine et la sulfadoxine-pyriméthamine , les CTAs ont été recommandées dans la prise en charge thérapeutique du paludisme simple dans la presque totalité des zones d'endémie palustre sous l'impulsion de l'OMS.

Au Tchad, les directives du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) recommandent en première intention du traitement du paludisme simple la combinaison Artésunate-Amodiaquine (ASAQ) et en deuxième intention en cas d'échec thérapeutique, de contre-indication ou d'intolérance à l'ASAQ, l'Artémether-Luméfantine (AL). 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 (MSP, 2014).

La prise en charge thérapeutique des cas de paludisme se heurte aujourd'hui à la résistance de *P. falciparum* aux dérivés d'artémisinine et à leurs molécules partenaires notamment l'amodiaquine, la luméfantine, la piperaquine etc...(Ménard *et al.*, 2017). En effet une résistance clinique à l'artémisinine, qui se manifeste par une clairance parasitaire retardée, a été

signalée pour la première fois à Pailin, dans l'ouest du Cambodge en 2009 (Noedl *et al.*, **2008**). Cette résistance s'est étendue à tous les pays de la sous-région du Grand Mékong (Ashley *et al.*, **2014**; Menard & Dondorp, **2017**). La présence d'une résistance aux médicaments partenaires de l'ACT a provoqué un échec du traitement avec DHA-PPQ, AL, etc. (Leang *et al.*, **2015**; Takala-Harrison & Laufer, **2015**).

La surveillance de l'efficacité des médicaments antipaludiques est un élément essentiel de la lutte contre le paludisme. En effet la résistance aux antipaludiques peut avoir des conséquences dévastatrices notamment une augmentation de la morbidité et de la mortalité.

La résistance aux dérivés d'artémisinine apparue en Asie du sud-est ces dernières années compromet gravement les acquis de la lutte engendrés grâce aux CTA.

L'association Artémether-luméfantine présente une bonne efficacité mais dans les régions à transmission élevée, la relative demi-vie de la luméfantine serait à l'origine d'une incidence élevée de réinfestation survenant rapidement après le traitement (Kanya *et al.*, **2007**; Yeka *et al.*, **2008**).

En Afrique de l'Est l'association AL serait plus efficace que l'ASAQ en raison probablement d'une prévalence élevée de parasites résistants à l'amodiaquine (Mutabingwa *et al.*, **2005**; Kanya *et al.*, **2007**).

Au Tchad, des études récentes ont montré l'efficacité de l'ASAQ (Souleymane *et al.*, **2017**) et une absence de mutations résistantes au niveau du gène *k13* propeller, gène de résistance à l'artémisinine (Issa, **2018**).

Auparavant, depuis l'introduction des CTA, seulement deux essais cliniques avaient été réalisés sur l'efficacité thérapeutique de l'ASAQ en 2009 et 2011 et ont montré l'efficacité de cette association au Tchad (Tchonfiene, **2013**).

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 XXème siècle. Une fois dans la vacuole digestive, la chloroquine inhibe la détoxification de l'hème en hémozoïne.

Devant des niveaux de résistance assez élevés observés en zone d'endémie palustre cette molécule n'est plus recommandée dans la prise en charge des cas de paludisme simple à *P. falciparum* même en combinaison aux dérivés de l'artémisinine. Cependant la chloroquine continue d'être utilisée pour le traitement du paludisme à *Plasmodium falciparum* non compliqué dans les régions où la résistance à la chloroquine est nulle ou faible (Okech *et al.*, **2015**) ainsi que pour traiter le paludisme à *Plasmodium vivax* (Amaratunga *et al.*, **2014**).

En effet, la plupart des souches de *P. falciparum* chloroquino-résistantes étudiées ont montré un déficit de concentration du médicament dans la vacuole digestive, plus probablement en rapport avec un efflux rapide de la chloroquine hors de la vacuole, qu'avec une diminution de la pénétration du produit (Lehane & Kirk, 2010). L'étude du génome des parasites résistants a permis l'identification d'un gène lié à la résistance à la chloroquine : *pfert* (*Plasmodium falciparum* chloroquine résistance transporter). De nombreux travaux de recherche ont démontré l'importance de la mutation K76T du gène *pfert* dans la résistance à la chloroquine (Fidock, 2000). Les études épidémiologiques ont révélé la présence de plusieurs mutations supplémentaires (environ 8 mutations) à K76T dans le gène *pfert*, définissant plusieurs haplotypes mutants.

Il a également été montré que l'expression de certains de ces haplotypes modifie le niveau de sensibilité à d'autres lysosomotropes utilisés seuls ou en association, dans le traitement des accès palustres simples ou graves, comme la quinine, la méfloquine, l'halofantrine, l'amodiaquine ou l'artémisinine (Singh Sidhu *et al.*, 2002; Miotto *et al.*, 2015)..

Ainsi conformément à leur capacité à modifier la physiologie de la vacuole digestive, les allèles de *pfert* modulent la sensibilité aux combinaisons thérapeutiques à base de dérivés d'artémisinine de première intention (Fidock *et al.*, 2012). Une méta-analyse portant sur de l'efficacité thérapeutique des deux CTA largement utilisées, l'ASAQ et l'AL, a révélé une réduction du temps de réinfection pour les parasites codant pour le mutant *pfert* (Venkatesan *et al.*, 2014).

La surveillance de la résistance aux médicaments partenaires aux CTA est primordiale en raison de la très courte demi-vie des artémisinines, qui laissent leurs médicaments partenaires à longue durée d'action seuls responsables de l'élimination des parasites restants (White *et al.*, 2009).

Le polymorphisme du gène *pfert* a été peu étudié au Tchad alors que la pression médicamenteuse semble être liée probablement à l'utilisation de la chloroquine en automédication.

La résistance aux dérivés de l'artémisinine constitue donc une menace sérieuse pour les zones d'endémie palustre. Des mesures urgentes doivent être prises pour éviter une propagation de cette résistance. La surveillance régulière de l'efficacité des combinaisons thérapeutiques à base de dérivés d'artémisinine devient indispensable afin de prévenir l'émergence de cette résistance dans notre pays. Par conséquent, il est important et nécessaire d'étudier l'émergence et la distribution de la résistance de *P. falciparum* à l'artémisinine et des molécules partenaires afin d'orienter les mesures de santé publique et une administration rationnelle au niveau des

collectivités locales. La protection de l'efficacité des traitements recommandés du paludisme devient dès lors une priorité absolue pour les pays d'endémie.

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. En phase avec cette recommandation, le PNLP planifie régulièrement des études pour évaluer l'efficacité des médicaments utilisés dans les formations sanitaires. C'est ainsi que cette étude a été menée à Massakory pour comparer l'efficacité thérapeutique de l'artésunate-amodiaquine et de l'artémether-luméfantrine. Les résultats issus de cette étude permettront au Ministère de la Santé Publique et de la Solidarité Nationale (MSPSN) de prendre une décision d'une part sur l'utilisation ou non de ces médicaments et au PNLP d'actualiser la base des données et d'autre part sur le retrait définitif de la chloroquine sur toute l'étendue du territoire.

Face aux problèmes de résistances actuels, plusieurs efforts individuels ou collectifs ont été consentis par les pays d'endémies pour surveiller l'émergence ou la diffusion des parasites résistants. Donc, il est important d'apporter des réponses aux trois questions de recherches suivantes :

1. Les associations Artesunate/amodiaquine et Artemether/luméfantrine seraient-elles toujours efficaces au Tchad pour justifier leur maintien en première et de seconde ligne de traitement du paludisme simple à *P. falciparum*?
2. Quel est le niveau de résistance actuel de *P. falciparum* à la chloroquine au Tchad notamment à Massakory ?

Par conséquent les hypothèses suivantes ont été émises :

1. L'ASAQ et l'AL seraient toujours efficaces dans le traitement du paludisme non compliqué à *P. falciparum* au Tchad.
2. La prévalence des mutations du *pfcr* conférant la résistance à la CQ serait faible à Massakory.

Les objectifs suivants ont été fixés :

Objectif général

Il s'agissait d'une part d'évaluer l'efficacité thérapeutique des associations artésunate-amodiaquine (ASAQ) et artémether-luméfantrine (AL) dans le traitement du paludisme simple à *P. falciparum* chez les enfants âgés de 6-59 mois dans le centre de santé de Massakory et d'autre part de déterminer le polymorphisme du gène *pfcr1*.

Objectifs spécifiques

1. Déterminer la réponse clinique et parasitologique adéquate et la tolérance de l'ASAQ et de l'AL après correction PCR;
2. Déterminer la proportion des enfants présentant un échec thérapeutique précoce, un échec clinique tardif, un échec parasitologique tardif ou une réponse clinique et parasitologique adéquate sans correction PCR ;
3. Déterminer la prévalence des mutations affectant le gène *pfcr1* des fragments d'ADN de *P. falciparum* des patients souffrant de paludisme simple de Massakory (Tchad) ;
4. Evaluer la tolérance des deux associations médicamenteuses.

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 de moustiques femelles infectés du genre *Anopheles* (OMS, 2019).

I.1.1. Agents pathogènes

I.1.1.1. 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: *Plasmodium falciparum*.

I.1.1.2. Espèces

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

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

Cependant un cas d'infection humaine par *P. cynomolgi* a été observé en Malaisie (Yap *et al.*, 2021).

○ *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. *Plasmodium 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, *P. falciparum* représente l'espèce la plus redoutable, car (Nambeole, 2014) et impliqué dans les phénomènes de pharmaco-résistance et de chimiorésistance.

I.1.2. Agent vecteur

Le vecteur est un moustique culicidés du genre *Anopheles*. Les moustiques se nourrissent et se reposent dans (endophiles) ou hors (exophiles) des maisons. Seule la femelle qui est hématophage assure la transmission de *Plasmodium*.

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 sub-saharienne, 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 par **Kérah et al** en 2010 (Kérah, 2010) il s'agit de :

1. *Anopheles gambiae s.s*,
2. *Anopheles arabiensis*,
3. *Anopheles pharoensis*,

4. *Anopheles funestus*,
5. *Anopheles ziemanni*,
6. *Anopheles rufipes* sp.,
7. *Anopheles wellcomei*,
8. *Anopheles squamosus*,
9. *Anopheles nili*,
10. *Anopheles coustani*.

I.2. Cycle évolutif de *Plasmodium*

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

I.2.1. Phase asexuée

Elle se déroule chez l'homme. L'anophèle 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 après, les sporozoïtes gagnent les cellules hépatiques et se divisent.

I.2.1.1. 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 (Prudêncio *et al.*, **2006**). 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**).

I.2.1.2. 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.

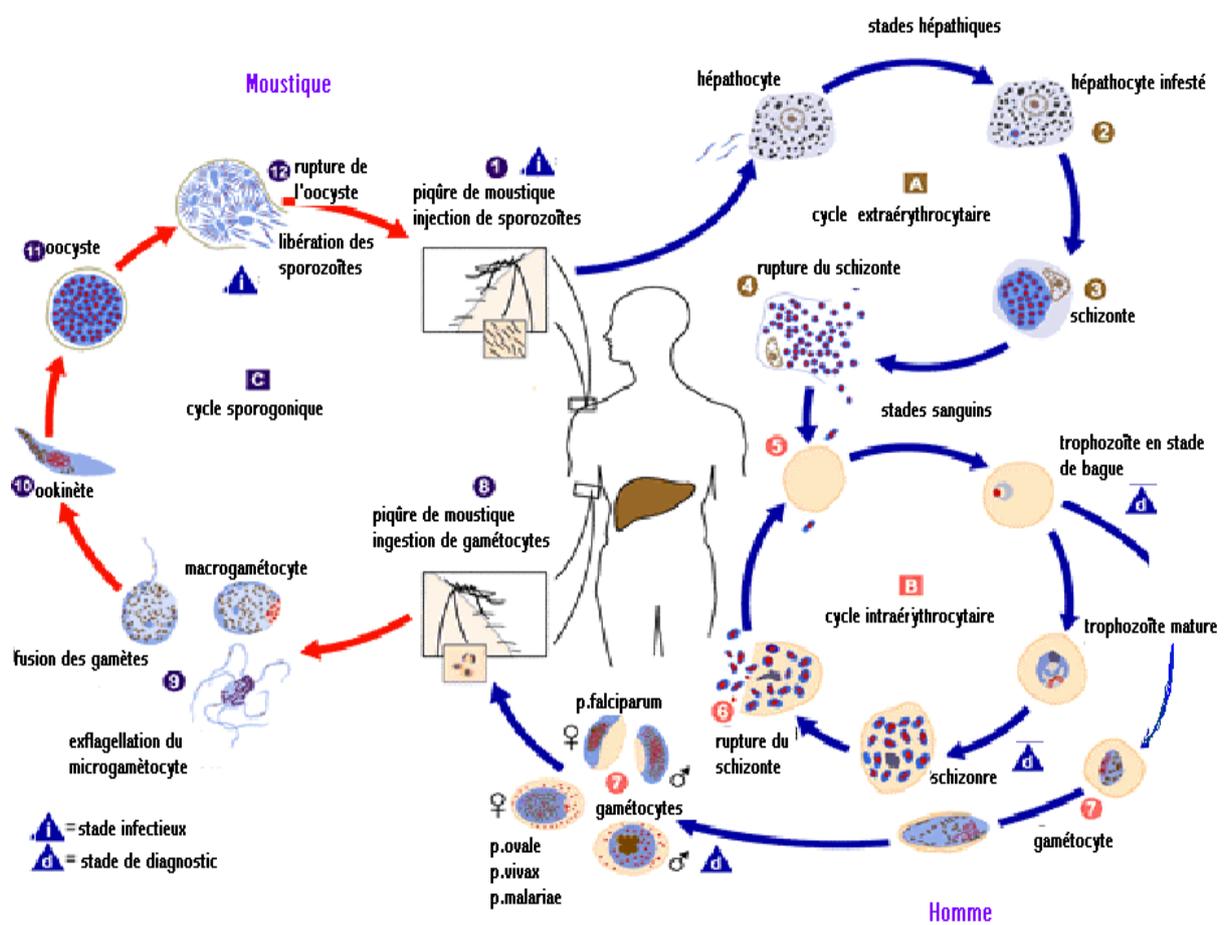


Figure 1 : Schéma du cycle de développement de *Plasmodium* (CDC, 2020)

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 macro gamète ; 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 (Siau *et al.*, **2008**).

I.3. Répartition géographique du paludisme

I.3.1. Monde

Le paludisme sévit d'une manière endémique dans les régions tropicales et subtropicales. En 2019, le nombre de cas de paludisme est estimé à 229 millions dans 87 pays d'endémie palustre et celui des décès à 409 000 dont 67% concernent les enfants de moins de 5 ans. L'incidence du paludisme (nombre de cas pour 1 000 habitants exposés au risque de paludisme) a reculé au niveau mondial, passant de 80 en 2000 à 57 en 2019. Mais entre 2015 (incidence de 58) et 2019, on note un net ralentissement de ce recul. La tendance est la même pour la mortalité associée au paludisme (nombre de décès pour 100 000 habitants exposés au risque de paludisme) qui est passée de 25 en 2000 à 12 en 2015, puis 10 en 2019. (OMS, **2019**).

I.3.2. Afrique

La région Afrique de l'OMS représente 94 % (215 M) des cas estimés dans le monde en 2019 et dans cette région, l'incidence du paludisme est passée de 363 à 225 sur la période 2000-2019.

Sur la même période, le nombre de décès a diminué de 44 % (680 000 en 2000, 384 000 en 2019) et la mortalité a baissé de 67 %, chutant de 121 à 40. (OMS, 2019). Selon l'OMS, 29 pays ont concentré 95 % du nombre total des cas de paludisme et le Nigéria (27 %), la République démocratique du Congo (12 %), l'Ouganda (5 %), le Mozambique (4 %) et le Niger (3 %) ont enregistré, à eux seuls, près de 51 % des cas. Près de 95 % des décès ont été enregistrés dans 31 pays, le Nigéria (23 %), la République démocratique du Congo (11 %), la Tanzanie (5 %), le Mozambique (4 %), le Niger (4 %) et le Burkina Faso (4 %) enregistrant près de 51 % des décès. (OMS, 2019).

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. (OMS, 2019).

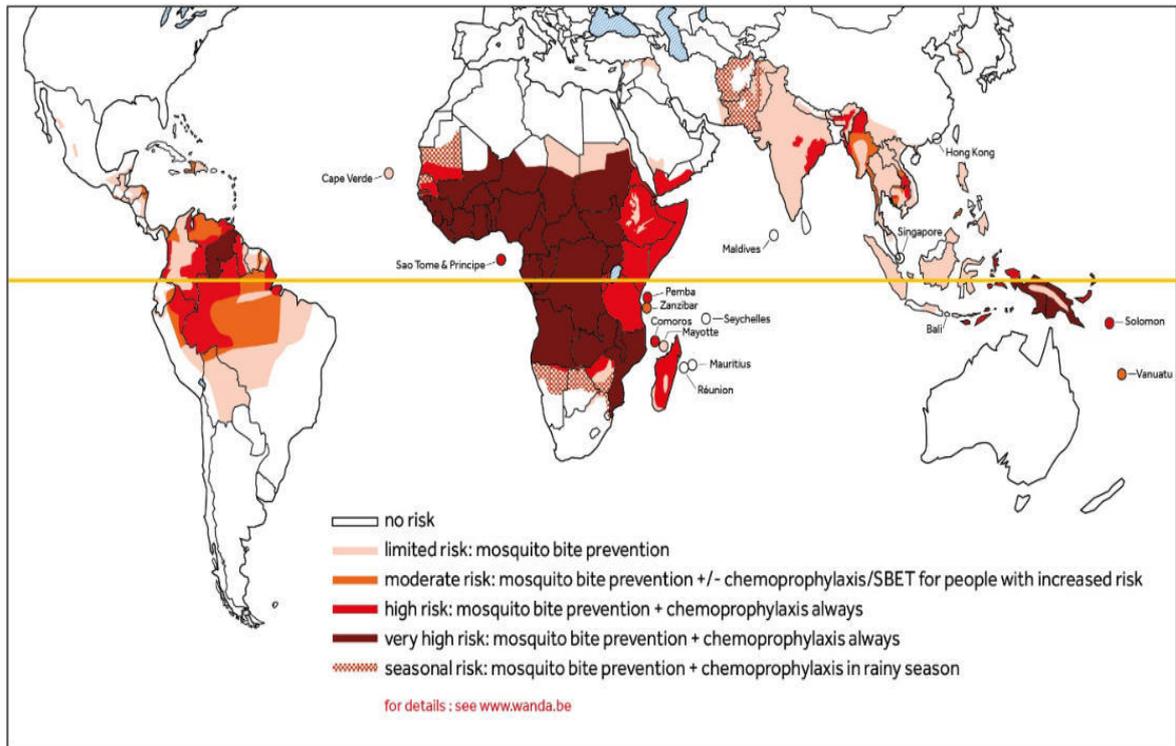


Figure 2 : Distribution mondiale du paludisme (OMS, 2019)

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 %) alors qu'elle est très faible (6,1 %) en zone sahélo-saharienne (DSIS, 2018).

Le Tchad présente trois zones bioclimatiques qui déterminent trois profils ou faciès épidémiologiques du paludisme :

- Il y a le nord désertique, où vit 2,6% de la population totale du pays, est constitué d'oasis et concentre la majorité des cas de paludisme importée ;
- Il y a le centre, dont le climat est de type sahélien correspond à un paludisme instable, en raison d'une transmission saisonnière courte. Cette zone représente 18,7% de la population totale ;
- Il y a enfin le sud, qui représente 78,7% de la population du pays, à climat soudanien, est caractérisé par un paludisme stable. La transmission, quoique saisonnière, est longue : plus de six mois. (Anonyme 1, 2017)

I.4. Formes cliniques du paludisme

L'apparition des signes cliniques dépendent de l'état immunitaire de chaque individu et de l'espèce plasmodiale. 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, 2019). 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- α) 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 définies comme critères de gravité par l'OMS (OMS, 2019).

I.4.3 Paludisme des populations à risque

I.4.3.1 Paludisme de l'enfant

Le paludisme est une cause majeure de mortalité et de morbidité chez l'enfant en zone d'endémie. 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 neurologique ou une anémie sévère. Ces deux complications sont responsables de la forte mortalité due au paludisme surtout entre 6 et 59 mois. En zone de paludisme stable, l'enfant va progressivement acquérir, plus ou moins rapidement en fonction de l'intensité de la transmission, une immunité protectrice qui le mettra à l'abri des manifestations graves du paludisme. Ce n'est qu'au prix de nombreux accès palustres que les survivants finissent par acquérir une immunité labile et incomplète. Fort de ces constats, plusieurs stratégies thérapeutiques visent cette tranche d'âge (ROGIER, 2003).

Le traitement préventif intermittent à base de Sulfadoxine Pyriméthamine réduit la survenue de paludisme et de l'anémie chez les enfants. Elle réduit de 27% toutes les causes de mortalité chez les enfants âgés de 4 à 18 mois négatifs (Dicko *et al.*, 2012). Les enfants âgés de 2 à 10 ans sont les plus exposés au paludisme et constituent un réservoir de gamétocytes. La chimio-prévention saisonnière doit cibler cette catégorie de tranche d'âge durant la période de haute transmission du paludisme (Guillebaud *et al.*, 2013). Une perte économique considérable est attribuée au paludisme chez les enfants dans plusieurs pays africains (Sidhu *et al.*, 2002).

I.4.3.2 Paludisme de 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, 2019). 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, 2019).

I.5. Diagnostic biologique 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 Épaisse

La Goutte Épaisse (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 1/10ème pendant 10 à 15 minutes. La lecture se fait au microscope optique à l'objectif 100.

Le seuil de détection est de 10 à 20 parasites asexués / μ 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 (Pina *et al.*, 2007).

1.5.1.2. Frottis Sanguin

L'étalement en monocouche des cellules sanguines et la coloration de celles-ci au Giemsa constitue une technique de diagnostic direct qui permet à la fois d'identifier l'espèce impliquée dans l'infection en cours par ses caractéristiques morphologiques et d'évaluer la parasitémie en déterminant le pourcentage d'hématies parasitées par des formes asexuées. D'autre part, elle est simple et peu coûteuse, mais nécessite une certaine expertise du microscopiste, et sa sensibilité est de l'ordre de 50 parasites par μ L. 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^{ème}. 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).

1.5.1.3. Tests de Diagnostic Rapide (TDR)

- **Principe** : Les TDR 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).

- **Avantages** : 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 (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 toujours 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 (Pina *et al.*, 2007).

1.5.1.4. Polymerase Chain Reaction (PCR)

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).

1.5.2. Diagnostic indirect

1.5.2.1. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

- **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.

- **Avantages** : 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 trousseaux 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. 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 exo érythrocytaires 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* (OMS, 2019)

I.6.1. Famille des lysosomotropes

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 lysosmotrope provient de l'analogie de pH observée dans la vacuole digestive des parasites et dans les lysosomes des cellules de mammifères (Coulibaly, 2008).

I.6.1.1. 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 de 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.

I.6.1.2. 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^{ème} 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.

I.6.1.3. 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^{ème} siècle. Cette famille comprend également l'amodiaquine, découverte en 1948. La chloroquine est une base faible lysosomotrope, elle est capable de traverser la membrane de l'érythrocyte parasité ; s'accumule dans la vacuole digestive du parasite suivant le gradient de pH. A l'intérieur de cette vacuole, l'hémoglobine est dégradée par les protéases et fournit les acides aminés nécessaires au parasite ; mais aussi produit des groupements d'hème toxiques comme dérivés (hématine). Le parasite normalement détoxifie l'hématine en polymérisant le dérivé en hémozoïne (McGready *et al.*, 2005). La chloroquine exerce son activité antimalarique en formant un

complexe avec l'hématine toxique pour le parasite, lequel inhibe sa séquestration en hémozoïne. L'hème libre est lytique pour la cellule.

La chloroquine empêcherait l'utilisation des acides aminés indispensables au parasite provoquant ainsi sa lyse. En tant que base faible, elle agirait en bloquant l'activité des lysosomes. La chloroquine inhibe également l'ADN polymérase des hématozoaires, et les protéases acides parasitaires.

Cette famille comprend également l'amodiaquine, découverte en 1948. Elle a une structure et une action antipaludique semblable à celle de la chloroquine. Elle possède des propriétés antipyrétiques et anti-inflammatoires. Elle est absorbée dans le tractus gastro-intestinal, transformée en un métabolite actif la deséthylamodiaquine. Des effets secondaires hépatiques et une grande incidence d'agranulocytose ont été rapportés (Ferdig *et al.*, 2004).

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 hydroxynaphtoquinones 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 jiroveci*. Contre les plasmodies, l'atovaquone a présenté une bonne activité schizontocide 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 (Looareesuwan *et al.*, 1999); d'où la nécessité d'association pour une meilleure efficacité. Parmi plusieurs antipaludiques testés,

le proguanil a montré *in vitro* une bonne synergie d'action et une potentialisation de l'atovaquone (Looareesuwan *et al.*, 1999). 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. (Looareesuwan *et al.*, 1999).

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'azithromycine sont également proposées avec les dérivés de l'artémisinine (Noedl *et al.*, 2008). 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 œsophagiennes. 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.*, 2008).

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. Seule 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 de dérivés d'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 (McGready *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 (McGready *et al.*, 2005). 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, 2019).

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 (Ministère de la santé, 2013).

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

I.8.1. Chimiorésistance

La chimiorésistance a été définie selon l'OMS, comme l'aptitude d'une souche d'hématozoaire à survivre ou à se reproduire malgré l'administration et l'absorption d'un médicament efficace employé à des doses égales ou supérieures aux doses recommandées mais dans les limites de la tolérance du sujet (OMS, 2020).

I.8.2 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 (Phuc *et al.*, 2017).

I.8.3. Amino-alcools

I.8.3.1. Quinine

I.8.3.1.1. Mode d'action

La quinine se concentre dans le plasma et se fixe sur les hématies dans lesquelles elle pénètre et intercale dans la réplication 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 malarique inoffensif et utilisable par le parasite grâce à cette enzyme (Pukrittayakamee *et al.*, 2004). Le complexe quinine-hème est capable d'endommager les membranes parasitaires

(Sugioka & Suzuki, 1991). La quinine bloque le cycle schizogonique au niveau des mérozoïtes libres dans le plasma ou encore des trophozoïtes avant leur transformation en schizontes.

I.8.3.1.2. 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 (Pradines *et al.*, 2010). La quinine est un antipaludique efficace cliniquement contre des souches résistantes à la chloroquine ou à la méfloquine.

I.8.3.2. Méfloquine

I.8.3.2.1. 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 *et al.*, 1989).

I.8.3.2.2. 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 (Lim *et al.*, 2009; Picot *et al.*, 2009). Cependant, l'association entre le nombre de copies de *pfmdr1* dans le génome ou des mutations sur *pfmdr1* n'est pas absolue suggérant l'existence d'autres mécanismes de résistance pour la méfloquine qui impliquent, des gènes encore méconnus (Jeffress & Fields, 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 luméfántrine, la pyronaridine et la pipéraquline (Humphreys *et al.*, 2007).

Les polymorphismes de l'allele sauvage du gène *pfmdr-1* N86 et *Pfcr1* K76 ont été associées à une réduction de la sensibilité à la Luméfantrine *in vitro* (Må *et al.*, 2005). Cependant, il a été suggéré que la sélection de l'allele *pfmdr-1* N86 peut représenter le marqueur de tolérance à la luméfantrine (Nessler *et al.*, 2004).

I.8.4. Amino-4-quinoléines

I.8.4.1. Chloroquine

I.8.4.1.1. 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 (Nessler *et al.*, 2004).

I.8.4.1.2. 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 (Pradines *et al.*, 2010). 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) (**Figure 3**) dans le phénomène de résistance à la chloroquine (Fidock, 2000). Il existe plusieurs hypothèses concernant la fonction de la protéine *pfcr1* codée par le gène *pfcr1*. En effet, *pfcr1* pourrait expulser activement la chloroquine de la vacuole digestive (Nessler *et al.*, 2004), altérer le pH vacuolaire où la chloroquine diprotonée pourrait être transportée passivement à l'extérieur de la vacuole par *pfcr1* muté (Afoakwah *et al.*, 2014).

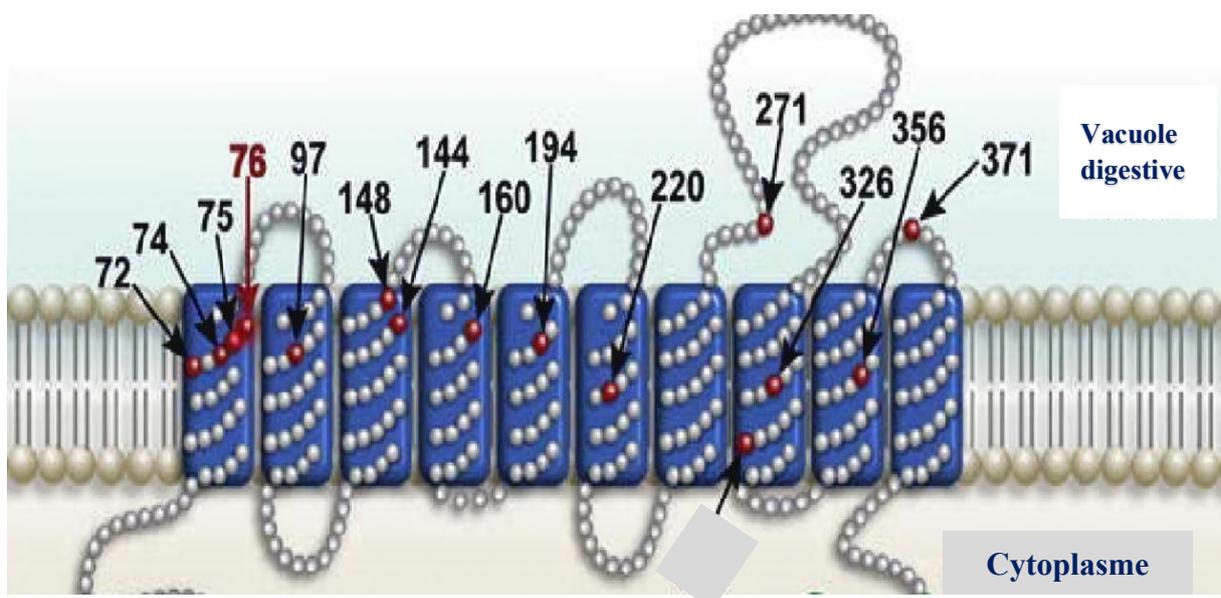


Figure 3 : Représentation schématique de *pfCRT* et des positions des mutations identifiées (Blasco *et al.*, 2017)

La mutation Lys76Thr du gène *pfert* 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 *pfert* ont été décrites (Fidock, 2000; Asare *et al.*, 2014). 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.

Mécaniquement, la CQ interagit avec l'hème dérivé de l'hémoglobine de l'hôte dans la vacuole digestive, où il inhibe la détoxification des espèces hémiques qui sont par ailleurs toxiques pour les parasites (Combrinck *et al.*, 2013). Le mutant *pfert* facilite le CQR en réduisant la capacité de la chloroquine à accéder à sa cible hémique (Nicholas *et al.*, 2013). Ceci est accompli par l'efflux de CQ induit par *pfert* mutant hors de la vacuole digestive et peut en outre être attribué à la modulation de la fonction native de *pfert* (Fidock *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2019). Les caractéristiques chimiques et moléculaires partagées entre les antipaludiques utilisés en clinique, y compris les constituants des thérapies combinées à base d'artémisinine (CTA) de première intention, incluent collectivement la présence d'un échafaudage structurel de type CQ, l'accumulation de médicament dans la vacuole digestive, l'inhibition de la détoxification de l'hème, et/ou activation médicamenteuse *via* l'hème (Hawley *et al.*, 1998).

I.8.4.2. Amodiaquine

I.8.4.2.1. Mode d'action

Le mode d'action de l'amodiaquine semble être le même que celui de la chloroquine (Pradines *et al.*, 2010). L'accumulation de l'amodiaquine est corrélée à celle de la chloroquine et est aussi diminuée chez les isolats chloroquino-résistants (Nessler *et al.*, 2004).

I.8.4.2.2. 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 *pfprt* et *pfmdr1* (Picot *et al.*, 2009).

I.8.5. Artémisinine et ses dérivés

I.8.5.1. Mode d'action

L'artémisinine et ses dérivés agissent au niveau de la membrane parasitaire, dès la 8^{ème} 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.8.5.2. 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 CTAs ont été identifiés en Asie du Sud-Est (Noedl *et al.*, 2008). Des mutations K189T, E252Q, R255K, P441L, F446I, N458Y, P574L, C580Y, A676D et H719N ont été mises en évidence par les chercheurs (Ariey *et al.*, 2014; Ménard *et al.*, 2016).

I.8.6. Antimétabolites

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

I.8.6.1. Antifoliques

I.8.6.1.1. 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 (Hyde, 2009).

I.8.6.1.2. 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 associés à la résistance de la sulfadoxine (Hyde, 2009). L'analyse de séquences du gène *dhps* montre des différences d'acides aminés entre des souches sensibles et résistantes à la Sulfadoxine (Hyde, 2009). Les mutations Ser436Ala, Ser436Phe, Ala437Gly et Lys540Glu du gène *dhps* confèrent une résistance à la Sulfadoxine (Wang *et al.*, 1997). Les mutations Ala581Gly et Ala613Thr/Ser sont rares, en particulier en Afrique, mais pourraient être associées à des degrés élevés de résistance (Picot *et al.*, 2009).

I.8.6.2. Antifoliniques

I.8.6.2.1. 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 (Hyde, 2009).

I.8.6.2.2. Mécanisme de résistance

Le gène *pf dhfr* est situé sur le chromosome 4 de *P. falciparum* et code pour la *dhfr* (Hyde, 2009). Les travaux sur *pf dhfr* 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.

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 (Chahar *et al.*, 2017).

I.8.7. Hydroxynaphtoquinones (atovaquone)

I.8.7.1. 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.8.7.2. 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.8.8. Antibiotiques (Doxycycline)

I.8.8.1. Mode d'action

La Doxycycline diminue le taux de nucléotides et de désoxynucléotides. 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* (Gaillard *et al.*, 2015).

I.8.8.2. 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 *et al.*, 2009). Différents gènes pourraient être impliqués dans la diminution de sensibilité *in vitro* à la doxycycline des isolats de *P. falciparum* (Briolant *et al.*, 2009).

PftetQ (*P. falciparum* tétracycline résistance T et Q 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 analogues à la tétracycline résistance protein T et A, 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 *et al.*, 2009).

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; Ménard *et al.*, 2013). Les principaux marqueurs moléculaires utilisés dans la surveillance de l'efficacité aux antipaludiques sont consignés dans le **Tableau I**.

Tableau I: Marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* selon les antipaludiques.

Classe d'antipaludiques	Molécule	Cible	Gène de Résistance	Références
	Agents lysosomotropes			
Quinoléines	Chloroquine	Synthèse d'Hémozoïne	<i>pfcr</i> <i>pfmdr1</i>	Fidock <i>et al.</i> 2000 et Sidhu <i>et al.</i> 2002
	Quinine	Synthèse d'Hémozoïne	<i>pfmdr1</i> <i>autre</i>	Pickard <i>et al.</i> 2003 et Price <i>et al.</i> 1999
	Méfloquine	Synthèse d'Hémozoïne	<i>pfmdr1</i> <i>autre</i>	Fidock <i>et al.</i> 2000 et Sidhu <i>et al.</i> 2002
	Amodiaquine	Synthèse d'Hémozoïne	<i>pfmdr1</i> <i>pfcr</i>	Peel <i>et al.</i> 1994 et Price <i>et al.</i> 2004
	Halofantrine	Synthèse d'Hémozoïne	<i>pfmdr1</i> <i>autre</i>	Echeverry <i>et al.</i> 2007
	Luméfantrine	Synthèse d'Hémozoïne	<i>pfmdr1</i>	Peel <i>et al.</i> 1994
	Artémisinine	Heme et protéines dans la vacuole digestive	<i>Kelch13</i> <i>pfmdr1</i> <i>autre</i>	Sidhu <i>et al.</i> 2006 Ariey <i>et al.</i> 2014 Price <i>et al.</i> 1999
Endopéroxydes naturels et dérivés semi-synthétiques	Artésunate		<i>pfmdr1</i> <i>autre</i>	Jambou <i>et al.</i> 2005
	Artémether		<i>pfatpase6</i>	
	Agents non lysosomotropes			
	Sulfadoxine	<i>dhps</i>	<i>pfdhps</i>	Wang <i>et al.</i> 1997
	Pyriméthamine	<i>dhfr</i>	<i>pfdhfr</i>	Peterson <i>et al.</i> 1990
Proguanil	<i>dhfr</i>	<i>pfdhfr</i>	Peterson <i>et al.</i> 1990	
Atovaquone	Cytochrome <i>b</i>	<i>pfcytb</i>	Korsinczky <i>et al.</i> 2000	

I.10. Dynamique des résistances

Les antipaludiques se fixent sur des récepteurs membranaires de l'hématie, induits par le 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).

Plasmodium falciparum, agent du paludisme, est devenu résistant à la plupart des antipaludiques et même aux derniers commercialisés, comme les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) en Asie du Sud-Est (Noedl *et al.*, 2008). Une des raisons qui pourrait expliquer le phénomène de résistance aux antipaludiques est que les molécules ne peuvent pas atteindre leurs cibles d'action à la suite d'un efflux actif de l'antipaludique hors du parasite. Il est estimé que plus de 100 protéines de transport seraient localisées au niveau de la membrane cytoplasmique de *P. falciparum* et de la membrane de la vacuole digestive. (Pradines *et al.*, 2020).

I.10.1. Facteurs favorisant les chimiorésistances

Quatre facteurs principaux entrent en jeu pour favoriser l'émergence de résistances. On a la pression médicamenteuse et la sélection des mutants, le degré d'immunité de la population, les voyages et les vecteurs *Anopholes*.

I.10.1.1. Pression médicamenteuse et la sélection des mutants

Dans une zone endémique, les parasites mutants sont peu nombreux par rapport aux 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 *et al.*, 2019).

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 (Toure A., 2011).

I.10.1.2. Degré d'immunité de la population

Le système immunitaire agit simultanément sur les souches sensibles qu'existent. 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. Anopheles Vecteurs

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

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

- Les tests *in vivo*;
- Les tests *in vitro*;
- Les tests moléculaires
- Le dosage des antipaludiques dans le sang.

I.11.1. Tests d'efficacité thérapeutique

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, 2019). Ces méthodes 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, 2019).

- ETP : il est défini soit quand il y a la présence de danger ou paludisme grave au jour 1, 2 au 3 et qui est associé à une parasitémie, soit quand la parasitémie au jour 2 est supérieure à celle du jour 0 quelle que soit la température axillaire ou soit une parasitémie au jour 3 et une température axillaire $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ et soit l'existence d'une parasitémie au jour 3 $\geq 25\%$ par rapport à la numération du jour 0 ;
- ECT : il est défini quand il y a des signes de danger ou paludisme grave en présence d'une parasitémie à n'importe quel jour entre le jour 4 et le jour 28 chez des patients qui ne répondaient auparavant à aucun des critères d'échec thérapeutique précoce ou soit à la précédente définition s'ajoute une température axillaire $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$;
- ECPT : il est défini par la présence d'une parasitémie entre le jour 7 et le jour 28 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 ;
- RCPA : c'est quand il y a absence de parasitémie au jour 28 quel que soit la température précoce, d'échec clinique tardif ou d'échec parasitologique tardif

I.11.2. Tests *ex-vivo*

Le test *ex-vivo* 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 (Singer *et al.*, 1997) 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.*, 2008).

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 *et al.*, 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. Grâce 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, 2011).

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel

II.1.1. Site de l'étude

L'étude a été menée dans le centre de santé de Massakory I, District Sanitaire Provincial (DSP) de Hadjer Lamis. Le Centre de Santé de Massakory I ([Maplink](#) Latitude : 13,0016804 Longitude : 15,7286011) est situé dans la ville de Massakory (**Figure 4**) à environ 160 km à la sortie Nord de N'Djamena. Massakory est le chef-lieu de la Province du Hadjer Lamis et du département de Dagana. Le Centre couvre une zone de responsabilité avec 46 villages ruraux et 9 quartiers urbains, le nombre d'habitants était estimée à 15122 en 2015. La ville de Massakory située entre le nord désertique, où vit 2,6% de la population totale du pays, est constitué d'oasis et concentre la majorité des cas de paludisme importée et le centre, dont le climat est de type sahélien correspond à un paludisme instable, en raison d'une transmission saisonnière courte. (DSIS, 2017). Le nombre de consultations mensuelles varie de 1000 en saison sèche à 2500 en saison des pluies à cause du paludisme et des prévalences élevées ont été rapportées chez les enfants âgés de moins de 5 ans (Annonyme 1, 2017). Le sang prélevé à Massakory 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.

II.1.2. Population de l'étude

L'étude a porté sur des patients âgés de 6 à 59 mois, venus en consultation au centre de santé de Massakory pour fièvre et autre signes évocateurs de paludisme. Les enfants de 6 à 59 mois sont vulnérables à l'infection palustre à cause de leurs états de prémunition ou faiblesse de leur système immunitaire (OMS, 2019). Ce groupe d'âge permet de mieux apprécier l'efficacité thérapeutique de l'artésunate-amodiaquine (ASAQ) et l'artéméther-luméfántrine (AL).

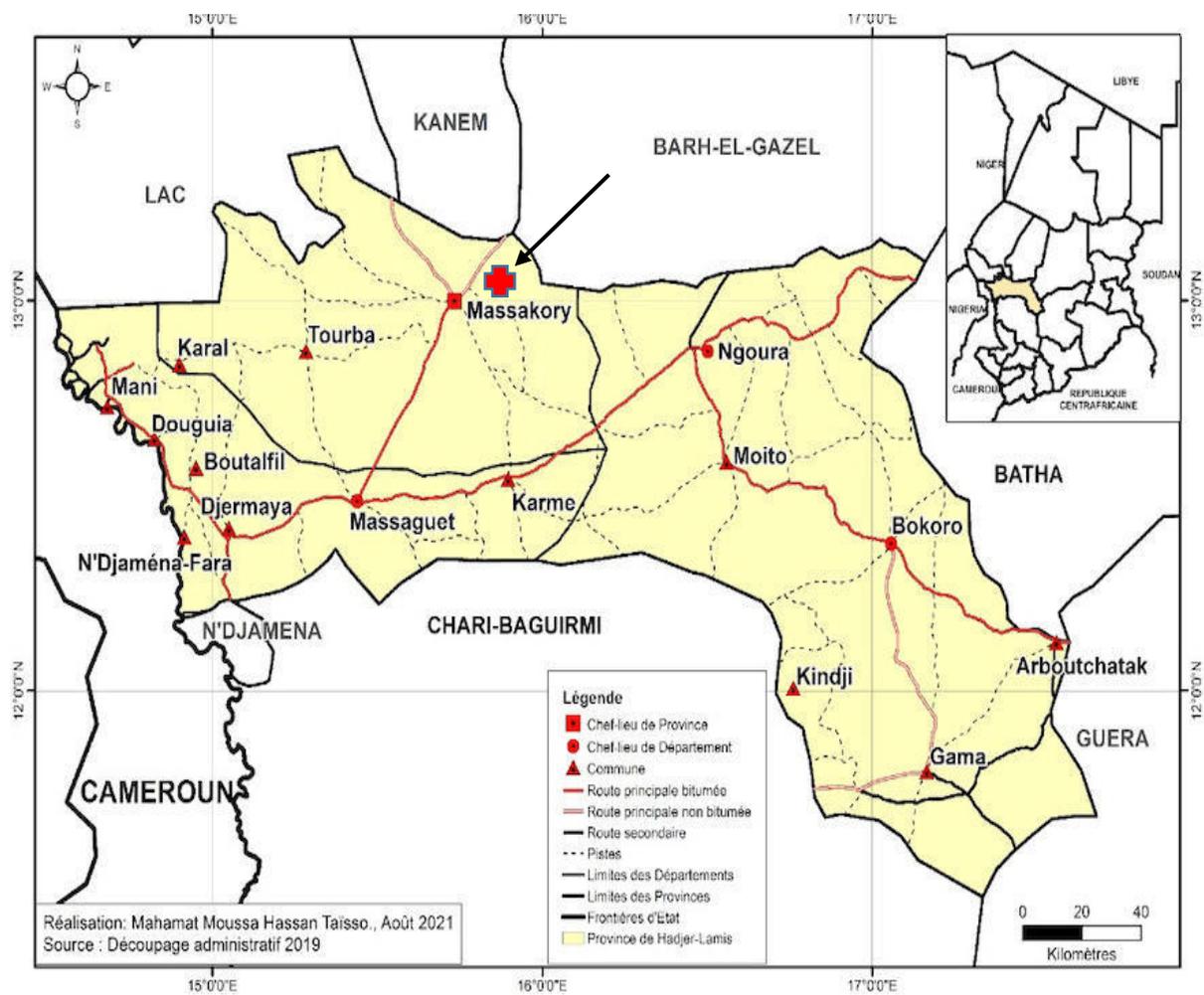


Figure 4 : Localisation du site de l'étude
(Découpage administratif 2019)

II.1.2.1. Critères d'inclusion

Pour être inclus dans cette étude, les critères suivants devraient être respectés. Ainsi, les enfants devraient avoir:

- Un âge compris entre 6 à 59 mois ;
- Une infestation mono spécifique par *P. falciparum* détectée par examen microscopique ;
- Une parasitémie comprise entre 2000 à 200.000 parasites asexués / μ L de sang
- Une température axillaire $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$, ou un antécédent de fièvre au cours des dernières 24 heures ;
- Une capacité à prendre des médicaments par voie orale ;
- Une possibilité et une volonté de respecter le protocole pendant la durée de l'étude et de respecter le calendrier de consultations ;
- Un consentement éclairé du père ou de la mère ou du tuteur de l'enfant.

II.1.2.2. Critères de non inclusion

Les enfants non inclus dans cette étude avaient :

- Une présence de signes généraux de danger chez les enfants de la tranche d'âge de signes de paludisme grave à *P. falciparum* selon les définitions de l'OMS (OMS, **2019**) ;
- Un poids corporel inférieur à 5 kg ;
- Une infestation mixte ou infestation mono spécifique par une autre espèce de plasmodium, détectée par examen microscopique ;
- Une malnutrition sévère définie pour un enfant dont la courbe de croissance se situe au-dessous de la courbe -3 de la valeur du z ;
- Une état fébrile dû à des maladies autres que le paludisme (par exemple rougeole, infection aiguë des voies respiratoires basses, maladie diarrhéique grave avec déshydratation) ou à d'autres maladies sous-jacentes chroniques ou graves connues (par exemple maladie cardiaque, rénale ou hépatique, VIH/sida) ;
- Une prise régulière de médicaments, qui risquerait d'interférer avec la pharmacocinétique du médicament antipaludique ; 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 périphérique recueilli au bout du doigt. Le prélèvement recueilli a servi à réaliser la goutte épaisse/frottis sanguin et les confettis sanguins pour les analyses moléculaires.

II.1.4. Matériel technique et réactifs

II.1.4.1. Matériel et réactifs pour la microscopie

Le matériel nécessaire pour la recherche des plasmodies dans le sang était constitué de :

- Un microscope optique binoculaire (Marque OLYMPUS) qui a servi à l'examen des lames de goutte épaisse et frottis sanguins minces,
- Des lames porte-objets sur lesquelles ont été déposés des gouttes de sang des patients,
- Un crayon à pointe diamant a servi pour enregistrer les données du patient sur la lame porte objet,
- Le May-Grünwald Giemsa a servi à la coloration des lames pour le diagnostic positif

II.1.4.2. Matériel pour l'étude moléculaire

- Un thermocycleur *C1000 Touch Thermal Cycler CFX96 Real-Time System* a été utilisé pour l'amplification des gènes (PCR à temps réel). Et un deuxième thermocycleur de type *GEN Amp PCR System-Applied Biosystem* pour la PCR classique.
- Une centrifugeuse Eppendorf a permis de séparer les différentes phases d'ADN pendant l'extraction ;
- Un congélateur (-20°C) et un réfrigérateur (+4°C) de marque MIDEA ont permis de conserver l'ADN extrait, les produits de PCR (amplicons) et les réactifs ;
- Un Poste de Sécurité Microbiologique (PSM) de type 2 (ESCO Class II BSC) a été utilisé pour protéger le manipulateur et préserver les échantillons de toute contamination ;
- Un thermomixer compact de type Eppendorf (24 échantillons) a été utilisé au cours de la PCR ;
- Un incubateur de type Eppendorf Thermomixer compact a été utilisé pour chauffer l'ADN à différentes températures notamment à 56°C pendant 1 heure, 70°C et 85°C pendant 10 min et 100 °C pendant 15 min ;
- Une cuve à électrophorèse MIDICELL PRIMO a permis de séparer les fragments d'ADN amplifiés ;

- La préparation du gel d'agarose a nécessité une balance de précision de type KERN pour peser les quantités précises de poudre d'agarose (2g pour 100 mL de TBE 1X) ;
- Un four à micro-onde ménager COOKWORKS a servi au chauffage de la solution d'agarose (poudre d'agarose dans du TBE (Tris Borate EDTA) 1X (Sigma®).
- La détection des produits d'amplification a été faite par le système Gel Doc E2 Imager «BIO-RAD Laboratories® » (U.S.A).

II.1.4.3 Réactifs et solutions pour l'étude moléculaire

L'extraction de l'ADN plasmodial a nécessité l'utilisation de la résine chelex 100 (BT Chelex 100 Resin) qui a été capable de piéger les contaminants et laisser en solution l'ADN plasmodiale. Le kit d'extraction Qiagen (QiAmp-Blood-Tissu extraction Kit) a été également nécessaire pour extraire 113 échantillons DBS.

Pour visualiser les fragments d'ADN après les amplifications, le Sybr® Safe DNA (C₂₈H₂₈N₂O₃S₂, Invitrogen, USA) a été utilisé comme agent intercalant lors de l'électrophorèse sur gel d'agarose. Le Tris Borate EDTA (TBE) de marque Promega Corporation Madison, USA) a été utilisé comme tampon de migration et de préparation du gel d'agarose.

La solution de Tampon 5X Flexi GO Taq a été utilisée comme colorant lors de la migration des échantillons. Les marqueurs de poids moléculaire DNA Ladder 100 pb (Promega®, Madison, USA) utilisée simultanément dans un autre puits lors de la migration ont permis d'estimer la taille des fragments des échantillons.

II.2. Méthodes

II.2.1. Types et période d'étude

Il s'est agi d'une étude de cohorte de deux bras correspondant à : un bras Artésunate-Amodiaquine (ASAQ) et un bras Artéméther -Luméfantine (AL). Les patients sont scindés en deux groupes correspondant aux molécules à évaluer. Après tirage au sort des médicaments, un code unique est attribué à chaque malade jusqu'à sa sortie (J28). L'étude a été réalisée du 14 décembre 2019 au 14 mars 2020 au centre de Santé de Massakory I.

II.2.2. Taille de l'échantillon

La taille de l'échantillon a été déterminée en tenant compte de la prévalence attendue d'échecs thérapeutiques à la combinaison Artésunate-Amodiaquine et Artéméther-Luméfantine dans la région. En 2015, l'étude réalisée au Tchad à Pala, Région de Mayo Kebbi Ouest a montré une efficacité de 100 % pour l'ASAQ. Concernant l'AL, aucune étude n'a été menée pour permettre la comparaison.

Cependant pour que l'AL soit efficace le taux d'échec doit être inférieur à 50% pour un niveau de confiance de 95% et une précision estimée à environ 10 % en utilisant la formule :

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

Avec $P = 0,5$; $Q = 0,5$; $z^2 = (1,94)^2$; $d^2 = (0,1)^2$

Ainsi, $Z^2 \times p \times q / (d)^2 = 94$, le facteur de correction était de 1,1 ; $n = 103$

$$94 \geq n \leq 103$$

94 enfants au minimum et 103 au maximum doivent être recrutés et suivis pendant 28 jours en tenant compte de 10% d'exclus et de perdus de vue. En conséquence, au minimum 94 patients et maximum 103 patient seront recrutés dans le site.

II.2.3. Recrutement des patients

Le protocole réalisé lors de cette étude a été validé par le Ministère de la Santé Publique et de la Solidarité Nationale du Tchad avec le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) et l'OMS. Cette étude s'inscrit dans le cadre des recommandations de l'OMS visant à évaluer les médicaments de première et de deuxième ligne utilisée pour la prise en charge du paludisme simple.

Après l'accueil du patient et de l'accompagnant (parent ou tuteur), le médecin de l'équipe de recherche a recueilli les symptômes présentés par le malade (fièvre, asthénie, anorexie, nausées, vomissements, douleurs abdominales, diarrhées, etc.) puis a procédé à un examen physique de ce dernier. En cas de diagnostic clinique de paludisme simple, le patient est orienté au Laboratoire pour la goutte épaisse GE et le frottis sanguin mince.

II.2.4. Procédures cliniques

Les sujets sélectionnés ont eu droit le premier jour (J0) à un interrogatoire puis un examen clinique ; une prise de température, une prise de poids, le résultat du TDR, une goutte épaisse, un frottis sanguin, et la confection d'un confetti aux jours d'inclusion et d'échec thérapeutique. Une procédure de suivi est mise en place à savoir : une prise de la température, un examen physique, une goutte épaisse et un frottis sanguin aux jours 1, 2, 3, 7,14, 21 et 28 de suivi, avec une recherche active et passive des effets indésirables pendant le traitement et au cours du suivi.

II.2.4.1. Randomisation et administration du médicament

Les patients recrutés et inclus dans l'étude ont reçu du médecin de l'équipe de recherche un traitement oral de l'ASAQ ou de l'AL sous forme de comprimés :

- **ASAQ₁** de **SANOFI** (*N° de lot 8MA127*, date d'expiration 01/01/2021) dosé en 25 mg artésunate / 67,5 mg amodiaquine de poids corporel pour le nourrisson (3-11 mois) et **ASAQ₂**(*N° de lot 8MA153*, date d'expiration 01/01/2020) dosé en 50 mg artésunate / 135 mg amodiaquine pour les petits enfants (3-5 ans), ont été administrées aux enfants en fonction de leur poids corporel, une fois par jour pendant 3 jours (**Tableau II**).

- **AL** de **CILPA** (*N° de lot B/NID73883*, date d'expiration 01/09/2020) dosé en 20 mg artémether / 120 mg luméfantrine, a été administré 2 fois par jour pendant trois jours (**Tableau II**).

Toutes les prises de médicament ont été faites sous contrôle du médecin de l'équipe pour les éventuels effets secondaires. Tout patient qui vomissait de manière persistante suite à la prise des médicaments a été exclu de l'étude et traité avec de la quinine par voie intraveineuse ou de l'artésunate par voie intramusculaire conformément aux directives nationales pour la prise en charge des cas graves. Du paracétamol a été donné à tout patient ayant une température corporelle supérieure à 38 °C. Les patients ont été régulièrement suivis jusqu'à J28 et ont bénéficié d'un examen clinique avec contrôle de la goutte épaisse et prise de température axillaire à J0, J1, J2, J3, J7, J14, J21 et J28.

Tableau II : Posologie des médicaments utilisés lors du suivi des participants

	Jour 0	Jour 1	Jour 2
Poids corporel (âge)	Artésunate - Amodiaquine (ASAQ)		
5 à 9 kg (< 3 ans)	1 Cp ¹	1 Cp ¹ 2 fois / jour	1 Cp ¹ 2 fois / jour
9 à 18 kg (≥ 3 - 8 ans)	2 Cp ²	2 cp ²	2 Cp ²
	Artéméther -Luméfantrine (AL)		
5 à 15 kg (< 3 ans)	1 cp x 2/j	1 cp 2x/j	1 cp 2x/j
15 à 25 kg (≥ 3 - 8 ans)	2 cp x 2/j	1 cp 2x/j	1 cp 2x/j

Cp¹ : comprimé dosé à 25 mg artésunate et 67,5 mg amodiaquine

Cp² comprimé dosé à 50 mg d'artésunate et 135 mg d'amodiaquine

II.2.4.2 Critère majeur d'évaluation de l'efficacité des molécules administrées

La proportion de patients ayant un échec thérapeutique précoce (ETP), échec clinique tardif (ECT), échec clinique parasitologique tardif (ECPT) ou réponse clinique et parasitologique adéquate (RCPA) à J28.

II.2.4.3. Critères d'évaluation secondaire

Le temps de clairance thermique, parasitaire et la tolérance de ces deux molécules.

II.2.5. Réalisation de la Goutte Épaisse (GE)

Avant la réalisation de la goutte épaisse et de frottis sanguin, une lame porte-objet 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 délicatement recueilli sur la lame étiquetée, une première goutte, puis une seconde. La première goutte a servi à réaliser la goutte épaisse, tandis que la 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 le code anonyme est noté sur la lame du patient avec un crayon. Les lames sont ensuite plongées pendant 20 à 30 minutes dans une solution de Giemsa 10% préparée extemporanément chaque jour. Elles sont ensuite examinées à immersion au grossissement X 100 pour le comptage des plasmodies à la GE et l'identification de l'espèce plasmodiale au frottis sanguin mince

La densité parasitaire (DP) est calculée selon la formule suivante :

$$DP (\mu L) = \frac{N \times 8000}{X} \quad \left| \begin{array}{l} DP : \text{densité parasitaire} \\ N : \text{nombre de parasites comptés} \\ X : \text{nombre de leucocytes comptés} \end{array} \right.$$

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

Les contrôles de qualités internes ont été réalisés par une équipe composée de Médecins parasitologues des différents CHU et Faculté de Médecine du Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche et de l'Innovation.

Critères d'évaluation de l'efficacité

Les critères d'évaluation valables pour cette étude sont l'échec du traitement (échec Thérapeutique précoce, échec clinique tardif, échec parasitologique tardif), la réponse clinique et parasitologique adéquate, les sujets perdus de vue, les sujets retirés de l'étude et la violation du protocole. Les résultats ont été exprimés en proportion des réponses cliniques et parasitologiques adéquates (ou en proportion du nombre d'échecs thérapeutiques précoces, d'échecs cliniques tardifs ou échecs parasitologiques tardifs) avant et après correction par PCR.

II.2.6. Techniques de biologie moléculaire

II.2.6.1. Réalisation de confettis sanguins

Trois (03) gouttes de sang ont été déposées séparément sur du papier Whatman 3MM préalablement étiqueté avec les identifiants du participant. Les identifiants comprenant le numéro de dépistage, site de l'étude, jour du suivi (**Figure 5**).

Le confetti ainsi réalisé a été laissé à la température ambiante au laboratoire durant 48H à l'abri des insectes. Après ce délai, les confettis ont été conditionnés dans un sachet zip contenant du gel de silice. L'ensemble a été acheminé au Département de Parasitologie-Mycologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire pour les analyses de biologie moléculaire.

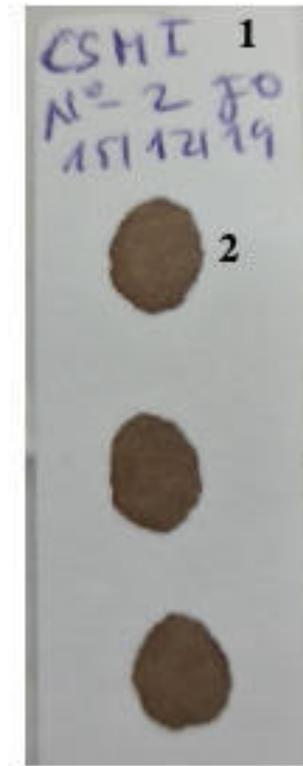


Figure 5 : Confettis de papier filtre Whatman 3 MM
(*Source : photothèque de l'étude*)

1. . Identifiant de l'échantillon
2. Goutte de sang séché

II.2.6.2. 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 (**Figure 6**) 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 seconde 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 1min. 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 a été mis dans la microcolonne puis centrifugé à 8000 trs/min pendant 1min. 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 1min. Une deuxième centrifugation à 14000 trs/min pendant 3min 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 1min. et a permis d'éluer l'ADN qui est récupéré dans le tube Eppendorf® de 1,5 mL. Les extraits d'ADN étaient conservés à -20 °C.

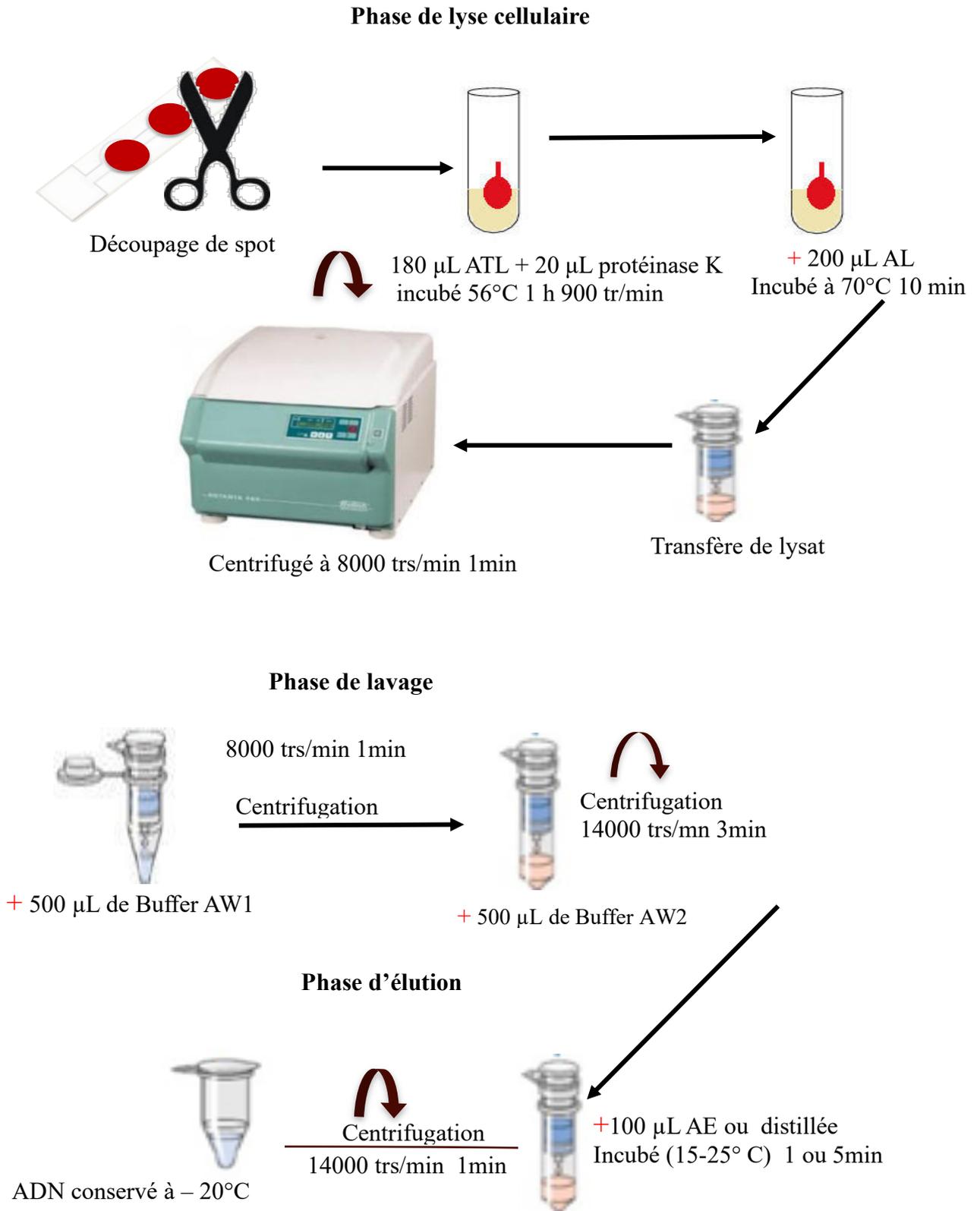


Figure 6 : Protocole d'extraction au Qiagen

II.2.6.3. Amplifications des gènes d'intérêt

II.2.6.3.1. Gènes étudiés

Pour le typage d'espèce plasmodiale, le gène ciblé a été celui de la sous-unité 18S de l'ARN ribosomale de *Plasmodium falciparum* (Snounou *et al.*, 1993).

Pour l'étude de la résistance à la Chloroquine, une séquence spécifique du gène *pfcr* situé sur le chromosome 7 et codant pour une protéine transmembranaire de la vacuole digestive de *Plasmodium* a été étudiée.

II.2.6.3.2. Préparation milieu réactionnel

Pour le typage de l'espèce plasmodiale, il a été réalisé une amplification génique temps réel (qPCR). Le milieu réactionnel a été composé de MasterMix d'enzyme *5X qPCR EvaGreen supermix no ROX with 12,5 mM MgCl2* de la société *SolisBiodyne* (enzyme, MgCl₂, DNTPs, intercalent), d'eau de qualité biologie moléculaire et d'amorces *FAL1/FAL2* (**Tableau III**).

Pour la détection des mutations ponctuelles sur le gène *pfcr*, il a été réalisé une amplification génique conventionnelle. Le milieu réactif a été composé de MasterMix d'enzyme *5X FIREPol MasterMix RTL with 12,5 mM MgCl2* de la société *SolisBiodyne* (enzyme, **MgCl₂**, DNTPs, tampon), d'eau de qualité biologie moléculaire et d'amorces *secIF/secIR* (**Tableau III**).

II.2.6.3.3. Programmes d'amplification

Pour l'amplification temps réel et l'amplification conventionnelle, le programme a débuté par une dénaturation des brins d'ADN à 95°C durant 10 minutes suivi de 31 cycles répartis comme suit : une dénaturation cyclique de 15 secondes à 95°C, une hybridation à 60°C pendant 2 minutes et une élongation cyclique d'une minute à 72°C. Après les cycles, il a été réalisé une élongation finale de 7 minutes à 72°C uniquement pour l'amplification conventionnelle (**Tableau IV**).

Tableau III : Séquences des amorces utilisées

Nom de l'amorce	Séquence (5'-3') des amorces	Type d'amplification génique
FAL1	TTAAACTGGTTTGGAAAACCAAATATATT	
FAL2	ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC	qPCR
SecIF (<i>pfert</i>)	GGTAAATGTGCTCATGTGTTTAAACTTATT	
SecIR (<i>pfert</i>)	TTACTTTTGAATTTCCCTTTTATTCCA	PCR-simplex

Tableau IV: Programmes d'amplification

Étapes	Température (°C)	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95	10 min	1 X
Dénaturation	95	30 sec	31 X
Hybridation	60	2 min	
Élongation	72	1 min	
Élongation finale*	72	7 min	1 X

* Seulement pour l'amplification conventionnelle

II.2.6.3.4. Électrophorèse des produits d'amplification

Les amplicons obtenus après amplification conventionnelle pour le gène *pfcr* ont été révélés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%.

Pour la réalisation de cette migration, dans un Erlenmeyer, 2 g d'agarose ont été pesés et délayés dans 100 mL de tampon TBE 1X (1 M Tris-HCl ; 0,8 M acide borique ; 2 mM EDTA ; pH 8,0). Le contenu de l' Erlenmeyer a été homogénéisé puis chauffé au micro-ondes pendant 3 minutes. Après le chauffage, 8 µL de SybrSafe (intercalant fabriqué par *Invitrogen*) ont été ajoutés à la solution et le contenu homogénéisé à nouveau, a été laissé à température ambiante pour refroidissement. Par la suite, le mélange a été coulé délicatement dans un moule portant des peignes, de sorte à éviter la formation de bulles capables de compromettre la migration des fragments d'ADN amplifié. Une fois solidifié, les peignes ont été retirés soigneusement du gel et le gel a été ensuite placé dans une cuve de migration (*MIDICELL PRIMO*) contenant du tampon TBE 1 X. Par la suite, 10 µL du produit d'amplification ont été déposés délicatement dans les puits du gel prévus pour la migration. En dehors des produits de PCR, il a été également déposé dans un des puits le témoin négatif d'amplification, le contrôle positif d'amplification ainsi que le marqueur de poids moléculaire (1000 bp DNA Ladder de *SolisBiodyne*).

L'ensemble a été porté à 135 volts pendant 20 min, puis le gel a été placé dans un système transluminateur UV à camera (Gel Doc TM EZ imager, *BIORAD*) relié à un ordinateur. Les images ont été visualisées à l'aide du logiciel *GelDoc*. La taille d'intérêt de l'amplicon a été de 241 pb.

II.2.6.3.5. Purification des amplicons

Le kit *Qiagen QIAquick Gel Extraction* a été utilisé pour réaliser la purification des produits de l'amplification génique conventionnelle. Pour cela, après migration, le gel a été découpé soigneusement au niveau de la bande puis transféré dans un tube Eppendorf.

Le fragment de gel a été transféré dans un tube Eppendorf de 2 mL et le tout a été pesé. Par la suite, 3 volumes de tampon QG ont été ajoutés pour 1 volume du gel au tube contenant le gel. Le tout a été incubé à 50°C dans un bain marie pendant 10 minutes jusqu'à dissolution complète du gel . Après dissolution totale, un volume d'isopropanol a été ajouté au tube et le tout a été transféré dans une colonne *QIAquick* puis centrifugé pendant 1 minute à 14000 tours/min. Après la centrifugation, il a été réalisé ensuite une série de lavage avec 750 µL de tampon PE ajouté dans la colonne *QIAquick* et centrifugé 14000 tours/min pendant 1 minute. Pour l'élution finale, 30 µL de tampon d'élution ont été déposés au centre de la membrane *QIAquick*, puis après une minute de repos une centrifugation a été réalisée à 8000 trs pendant une minute. Les

amplicons ainsi purifiés ont été rangés dans des boîtes adéquates et conservés à -20°C dans un congélateur, pour une utilisation prochaine.

Après purification, 1 microlitre du produit purifié a été utilisé pour lire la densité optique afin de vérifier la concentration en acide nucléique.

II.2.6.4. Séquençage du gène *pfcr*

Les amplicons purifiés ont été séquencés de façon automatique par la méthode Sanger à la plateforme de séquençage Sanger CRCHU de Québec (Canada). Les échantillons conditionnés selon les recommandations de la plateforme ont été envoyés *via* une société de livraison internationale tout en respectant les lois et réglementations d'envois d'échantillons.

II.2.6.5. Analyse des résultats de biologie moléculaire

II.2.6.5.1. Analyse des résultats de qPCR

Un seuil de détection appelé "Ct" (Cycle Threshold) a été déterminé en se basant sur l'amplification du témoin positif. Tous les échantillons ayant un Ct en dessous de celui du témoin positif ont été considérés comme négatifs alors que les autres ont été enregistrés comme positifs.

II.2.6.5.2. Analyse des résultats d'amplification conventionnelle

La taille de l'amplicon d'intérêt a été de 241 pb. Un échantillon est dit positif s'il présente la bande d'intérêt à la taille attendue.

II.2.6.5.3. Analyse des données de séquençage et identifications des mutations

Les données de séquençage brutes ont été nettoyées à l'aide du logiciel MEGA 11. Toutes les séquences ont été alignées ensuite à l'aide du logiciel BioEdit 7.2.5 en utilisant comme séquence de référence du gène *pfcr* la séquence *PF3D7_0709000.1* disponible sur *PlasmoDB* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Au niveau de la souche sauvage, les positions d'intérêt induisant une résistance à la chloroquine sont les codons Cys-72, Val-73, Met-74, Asn-75, Lys-76 pour une combinaison allélique sauvage de CVMNK. Toute mutation ponctuelle observée au niveau de ces codons serait d'un intérêt car indiquant une chloroquino-résistance de la souche en présence.

Les mutants purs sont définis comme l'absence du type sauvage en tous les codons et indique l'homogénéité des populations parasitaires d'un isolat donné. Par contre un « codon mixte » ou un « isolat mixte » signifie la présence de deux bases alternatives, sauvage et mutante, en même temps et indique l'hétérogénéité génétique des populations parasitaires d'un isolat donné.

II.2.7 Analyse statistique des données

Le tableur ExcelTM développé par l’OMS a été utilisé pour la gestion et l’analyse des données. Les données étaient analysées au moyen des deux méthodes suivantes : méthode de Kaplan-Meier, et analyse «Per Protocol» les pourcentages de RCPA ont été calculés avec un intervalle de confiance à 95%. Les patients remplissant l’un des critères suivants étaient classés parmi les sujets retirés de l’étude : Retrait du consentement, Traitement non achevé, Non-observation des dispositions relatives au recrutement, Non-respect volontaire ou involontaire du protocole, Résultats de la PCR indéterminés ou échec est dû à une réinfestation par *P. falciparum*.

L’analyse finale comportait les éléments suivants :

- Variable principale d’efficacité thérapeutique avec deux critères de jugement: Taux brut de succès cumulé et taux d’échec cumulé aux jours 28, non corrigés
- Puis une analyse secondaire avec les données corrigées par PCR avec:
 - description de tous les patients ayant fait l’objet d’un dépistage et les motifs de non inclusion dans l’étude ;
 - description de tous les patients inclus dans l’étude ;
 - proportion de manifestations indésirables et de manifestations indésirables graves chez tous les patients inclus dans l’étude ;
 - proportion de patients perdus de vue ou retirés de l’étude, avec des intervalles de confiance de 95 % et une liste des motifs de retrait ;
 - prévalence du gène de résistance de *pfert* ;
 - proportion d’échecs thérapeutiques précoces, d’échecs cliniques tardifs, d’échecs parasitologiques tardifs et de réponses cliniques et parasitologiques adéquates aux jours 28, avec des intervalles de confiance de 95 %, non corrigée par PCR.

Le test statistique *t student* a été utilisé pour calculer les ECART-TYPES entre les différentes densités parasitaires des participants et les moyennes des températures.

II.2.8 . Considérations éthiques

Avant le début de l’étude, le protocole s’inscrivant dans le cadre des recommandations de l’OMS visant à tester les médicaments notamment les CTAs utilisés en 1^{ère} et 2^{ème} ligne, a reçu l’approbation du Ministère de la Santé Publique ainsi qu’une autorisation de recherche du Ministère de l’Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l’Innovation du Tchad (**Annexe 1**). Tous les parents / tuteurs des enfants ont reçu une explication claire de l’étude et un consentement éclairé a été obtenu avant la réalisation d’une quelconque procédure de l’étude.

III. RESULTATS

III.1. Test d'Efficacité Thérapeutique de l'ASAQ et de l'AL

III.1.1. Aspects épidémiologiques

III.1.1.1. Profil de la population

Au total 113 patients ont été recrutés pour paludisme simple et inclus au cours de la période d'étude répartis comme suite après randomisation : 57 patients dans le groupe Artésunate-Amodiaquine (ASAQ) et 56 dans le groupe Artémether-Luméfantrine (AL) (**Tableau V**).

Parmi ces 113 patients inclus, 103 (91,1%) ont été suivis jusqu'à J28 dont 51 dans le groupe AL contre 52 dans le groupe ASAQ (**Figure 7**).

III.1.1.2. Caractéristique générale de la population d'étude

L'âge des patients variait entre 6 mois et 59 mois . Les enfants de 48 à 59 mois étaient les plus représentés respectivement avec 30,1% dans le groupe AL contre 18,5% dans le groupe ASAQ (**Figure 8**).

La température des enfants variait entre 36°C et 40,9°C avec une moyenne de 38,6°C pour le groupe AL et entre 36 °C et 40,8°C avec une moyenne de 38,5 °C pour le groupe ASAQ. Le poids des enfants variait entre 7,7 kg et 22,8 kg dans le groupe AL avec une moyenne de 14 kg et entre 5 kg et 20,4kg dans le groupe ASAQ avec une moyenne de 12 (**Tableau V**)

Sur les 56 patients inclus dans le groupe AL, 32 étaient de sexe masculin soit un sex-ratio M/F de 1,3 ; tandis que dans le groupe ASAQ, le sex-ratio H/F est de 1,2 avec le même nombre de patients de sexe masculin (32) (**Tableau V**).

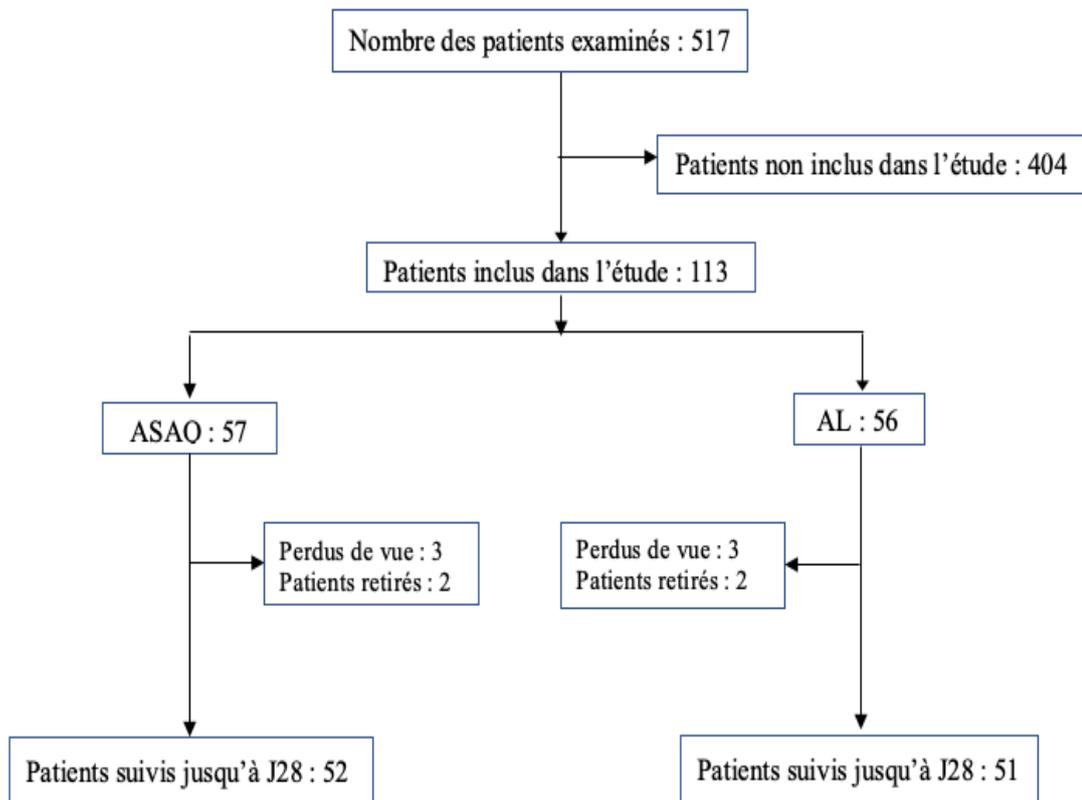


Figure 7 : Répartition des patients par groupe de traitement

ASAQ : Artésunate-Amodiaquine ; AL : Artémether-Luméfantrine

Tableau V : Caractéristiques clinique et paraclinique de la population d'étude

Caractéristiques	Molécules	
	AL	ASAQ
Nombre de patients	56	57
Masculin	32	32
Féminin	24	25
Ratio H/F	1,3	1,2
Groupe d'âges		
48 - 59 mois	15	8
< 48 mois	41	49
Moyenne (ds ¹)	3,6 (1,2)	2,7 (1,4)
Extrêmes (min – max) en année	1 – 5ans	0,5 – 5 ans
Poids (kg) à J0		
Poids moyen (kg) (ds)	14 (3,3)	12 (3,6)
Extrêmes (min – max) en kg	7,7– 22,8	5-20,4
Température (°C) à J0		
Température moyenne (ds) °C	38,6 (1,4)	38,5 (1,3)
Extrêmes (min – max) °C	36 – 40,9	36 – 40,8
Parasitémie (µL) à J0		
Moyenne de parasitémie (p.a. ² /µL)	11712	9534
Parasitémie extrême (min – max), p.a. /µL	2080 – 35000	2100 – 35640

J0 = premier jour d'inclusion puis de suivi des patients

¹*ds : déviation standard*

²*pa : parasites asexués*

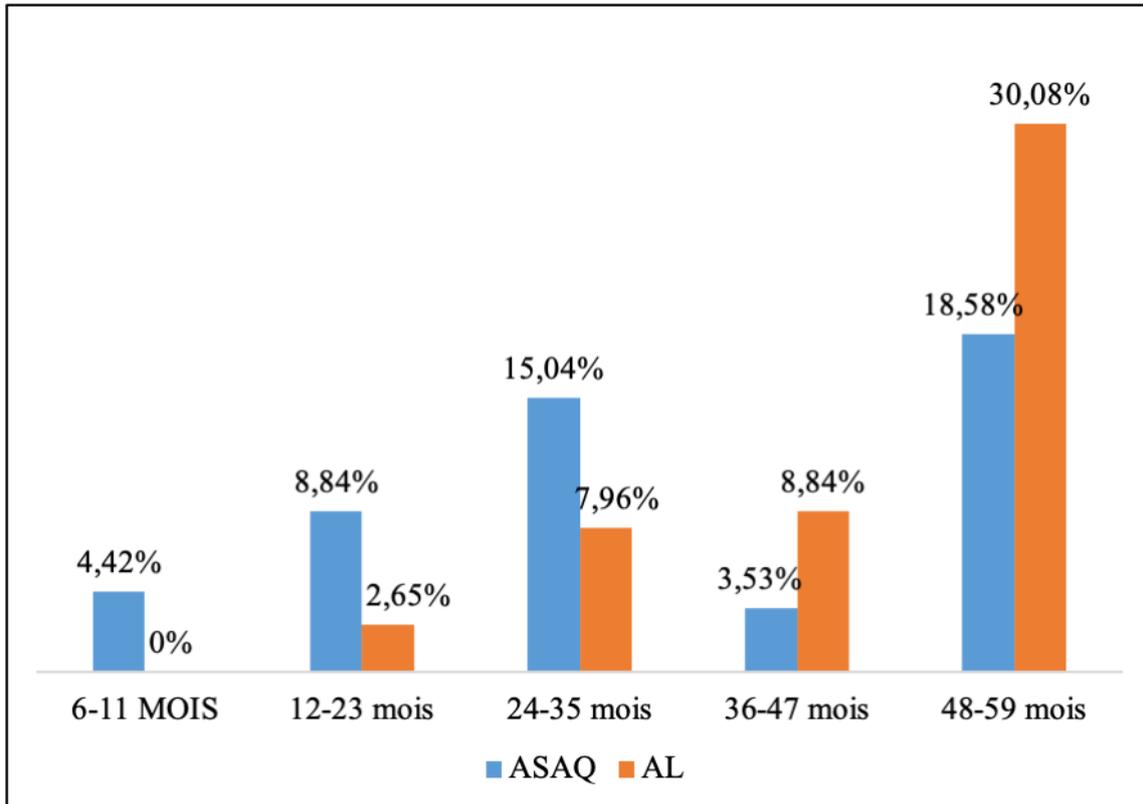


Figure 8 : Répartition des patients selon les tranches d'âge dans les deux groupes de traitement

III.1.2. Efficacité clinique

- Evolution du nombre des sujets apyretiques

De J1 à J28 et 55 patients du groupe ASAQ (**Figure 9**) et 56 patients du groupe AL (**Figure 10**) étaient apyrétiques avec des proportions respectives de 98,24 % et 98,21.

- Clairance thermique

Avant traitement à J0 les températures moyennes étaient de 38,6°C dans le groupe AL contre 38,5°C dans le groupe ASAQ. Après traitement à J3 la température corporelle moyenne était de 36,7°C dans le groupe AL et ASAQ. AJ28 elles étaient de 37 dans AL contre 37,1 dans ASAQ (**Figure 11**).

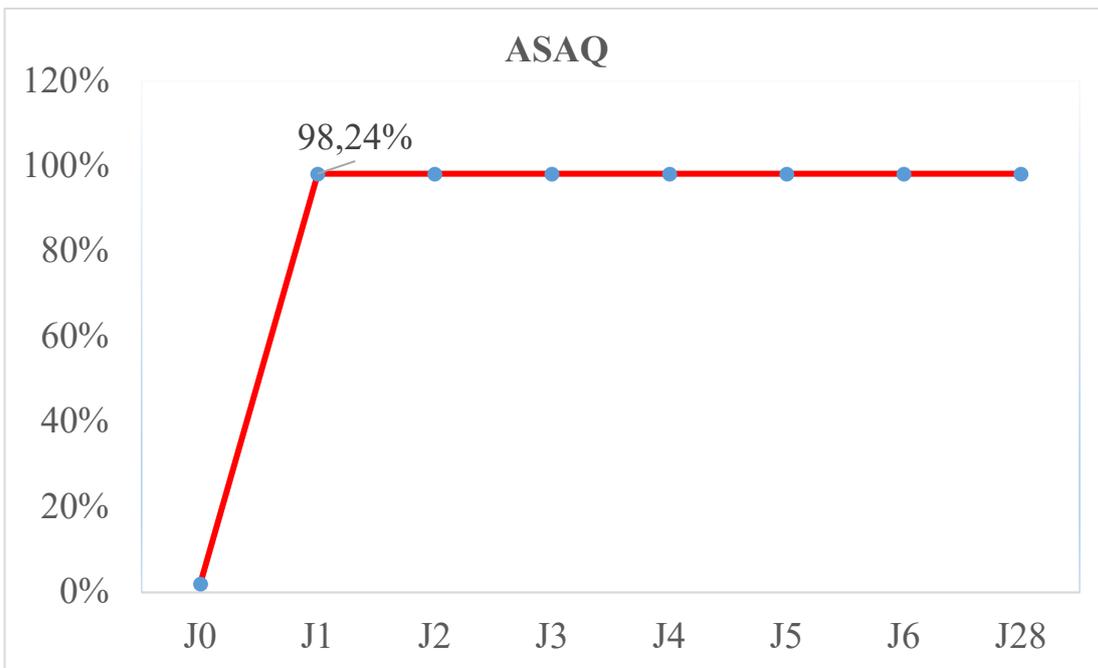


Figure 9: Proportion des sujets apyretiques du groupe artésunate-amodiaquine (ASAQ)

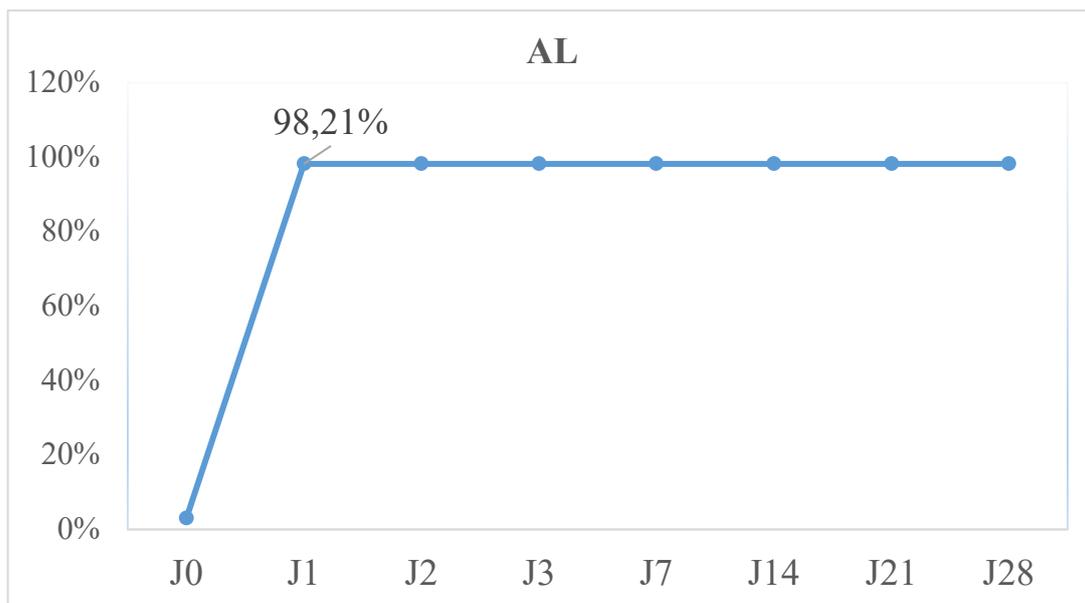


Figure 10: Proportion des sujets apyretiques du groupe arthéméter-luméfantine (AL)

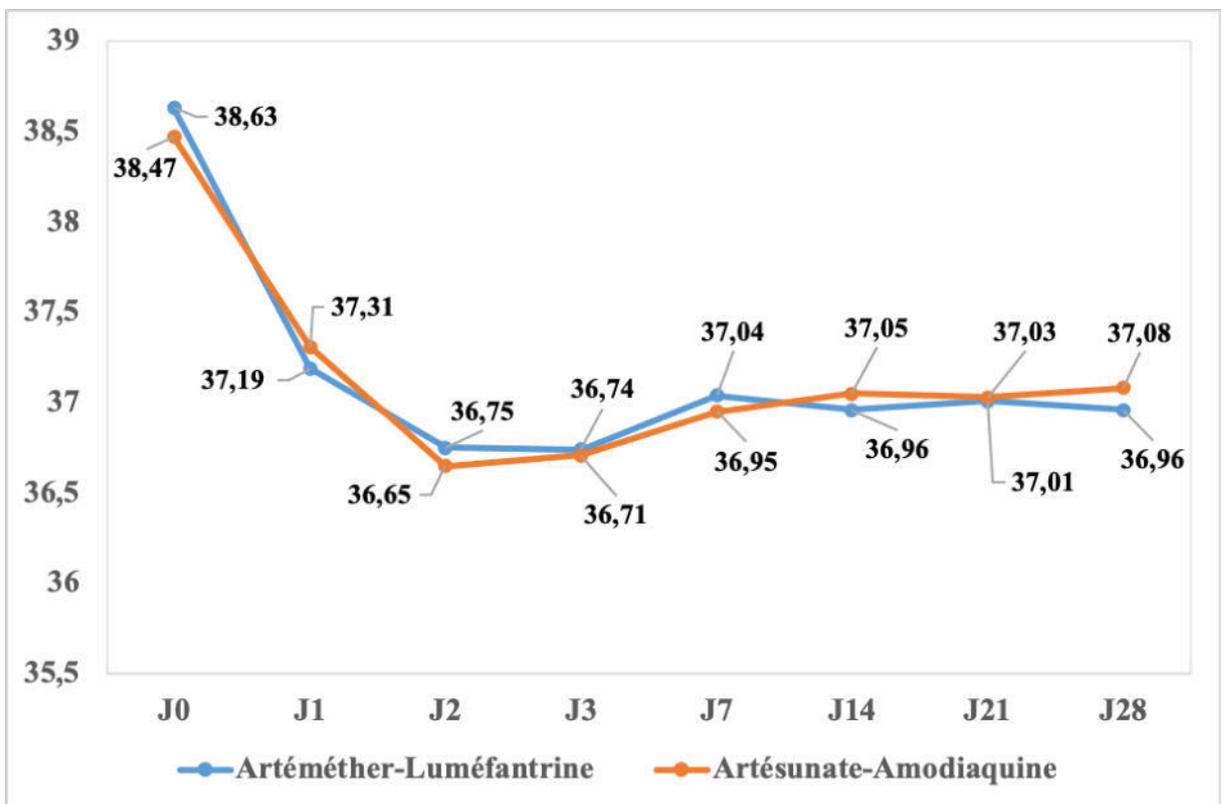


Figure 11 : Évolution de la température moyenne

III.1.3. Efficacité parasitologique

- La parasitémie

La densité parasitaire à J0 variait entre 2080 et 35000 (ET 7921,20) pour le groupe AL contre 2100 et 29080 (ET 8471,26) pour ASAQ. Les densités parasitaires (DP) les plus élevées représentaient 40,35 % et 35,71 % respectivement pour AL et ASAQ (**Figure 11**).

- Clairance parasitaire

A J2 dans le groupe ASAQ 6 patients présentaient encore des parasites selon l'évolution du nombre des sujets sans parasitémies (**Figure 12**)

A J0 les moyennes des densités parasitaires dans les deux groupes étaient de 13711,42 dans le groupe AL contre 11292 dans le groupe ASAQ ; les densités étaient nulles de J3 à J28 (**Figure 13**).

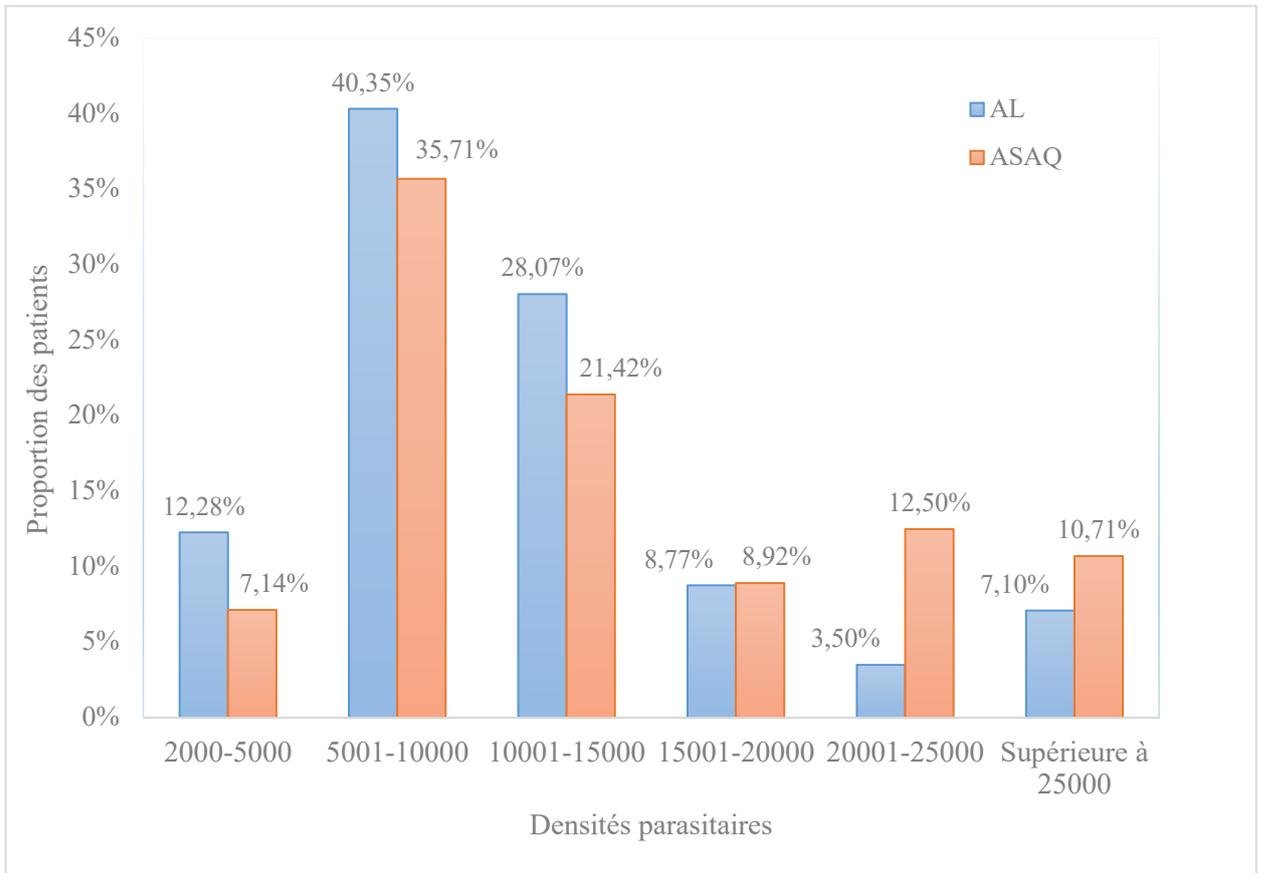


Figure 12 : Répartition des patients selon les densités parasitaires et le type de traitement

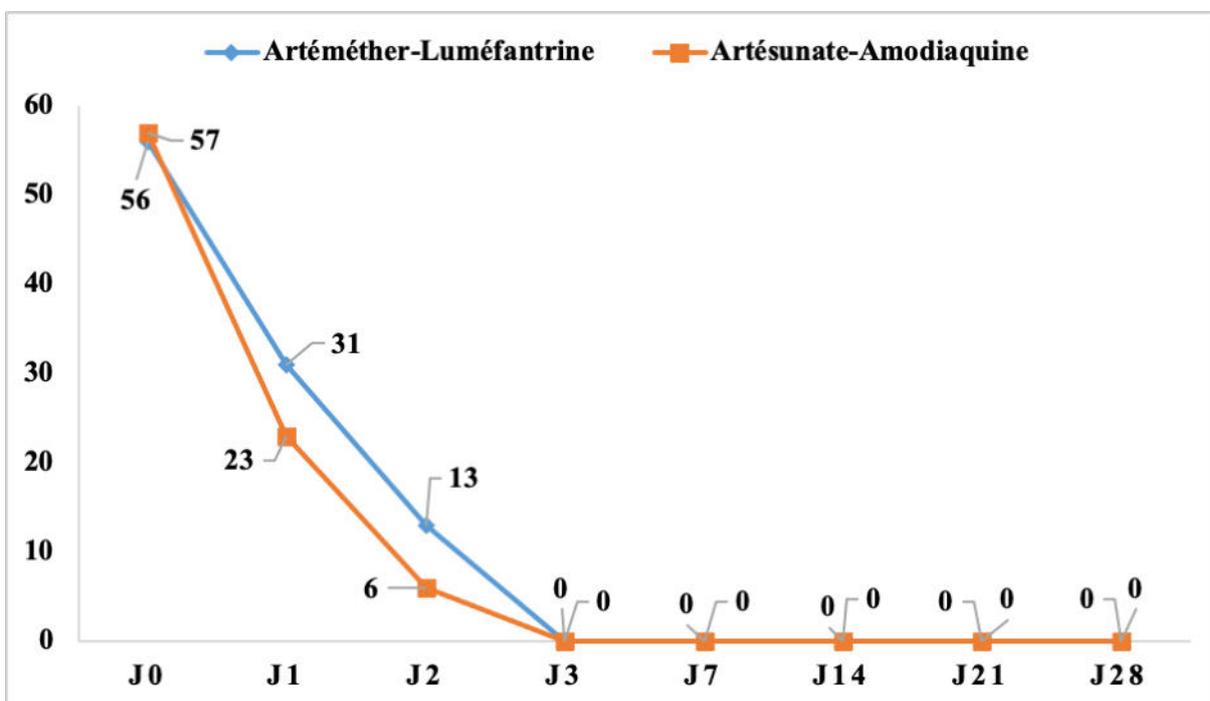


Figure 13 : Évolution du nombre de sujets sans parasitemie

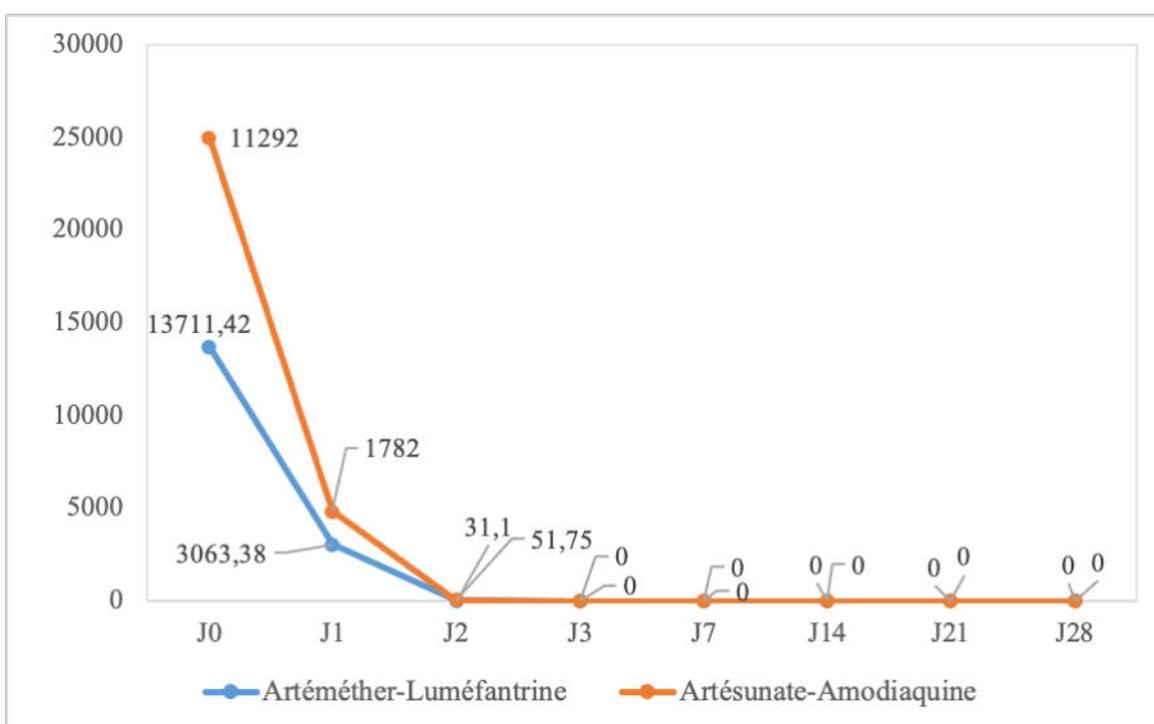


Figure 14 : Évolution de la densité parasitaire (DP) moyenne

II.1.4. Réponse thérapeutique

La réponse thérapeutique de AL et de ASAQ à J 28 avait été évalué en per protocole ; A J28 la réponse clinique et parasitologue adéquate (RCPA) était de 100% pour les deux groupes AL et ASAQ.

Aucun échec thérapeutique précoce (ETP), échec clinique tardif (ECT) et échec parasitologique tardif (EPT) n'a été obtenu dans les deux groupes (AL : IC compris entre 0.0-7.0 et ASAQ : IC compris entre 0.0-6.8) (**Tableau VI**)

II.1.5. Évaluation de la tolérance clinique

Les évènements indésirables les plus fréquents étaient l'asthénie et l'anorexie avec un pourcentage similaire de 13,2 % dans les deux groupes (AL et ASAQ) suivis de 6,1 % des douleurs abdominales et des diarrhées dans les deux groupes. Les vomissements étaient rencontrés uniquement dans le groupe AL (**Figure 15**).

Tableau VI: Réponses au traitement à J28 en fonction des deux types de molécules

Paramètres	AL		ASAQ	
	Nombre (%)	IC	Nombre (%)	IC
ETP	0 (0,0)	0,0 – 7,0	0 (0,0)	0,0 – 6,8
ECT	0 (0,0)	0,0 – 7,0	0 (0,0)	0,0 – 6,8
EPT	0 (0,0)	0,0 – 7,0	0 (0,0)	0,0 – 6,8
RCPA	51 (100,0)	93 – 100,0	52 (100,0)	93,2 – 100,0
Total	51		52	

ETP : Échec thérapeutique précoce

ECT : Échec clinique tardif

EPT : Échec parasitologique tardif

RCPA : Réponse clinique et parasitologique adéquate

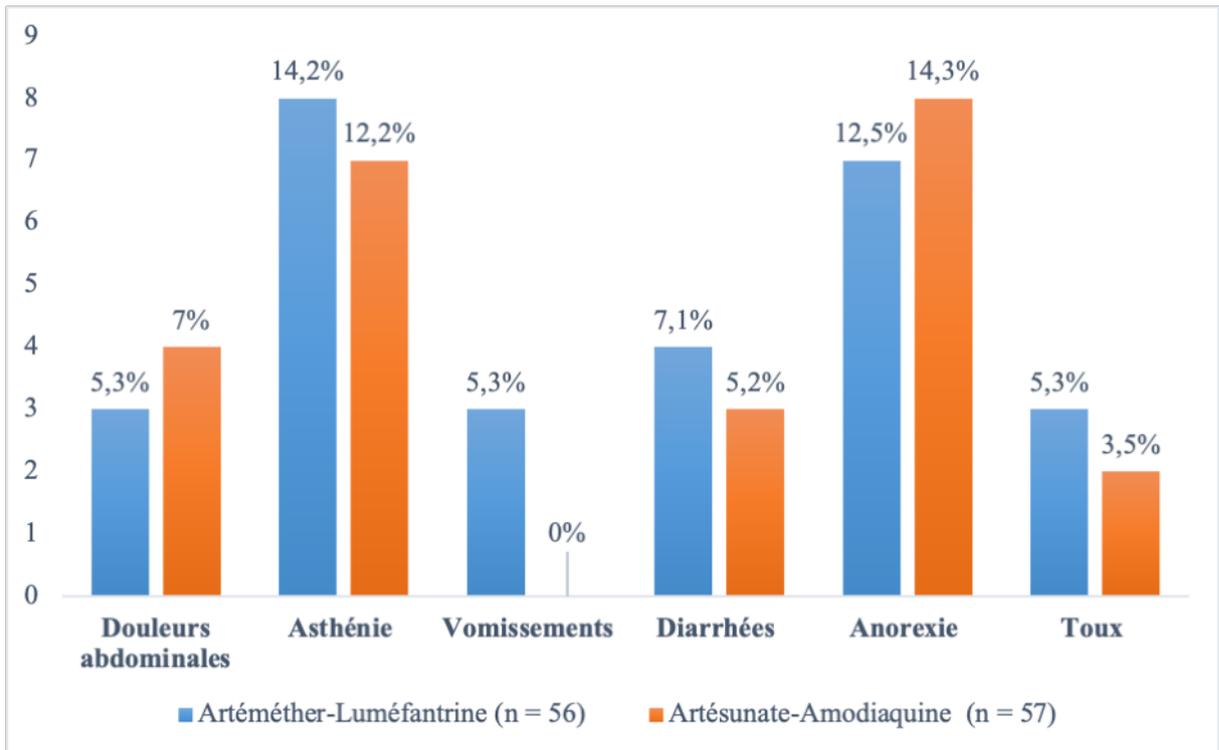


Figure 15 : Proportion des évènements indésirables

III.2. Caractérisation moléculaire du gène *pfcr*

III.2.1. Extraction et quantification de l'ADN

Au total 113 échantillons ont été extraits en suivant les recommandations de fabricant du Kit *Qiagen*. Ces concentrations d'ADN ont varié de 1,58 à 22,65 ng/μL avec moyenne de 8,58 ng/μL. (**Annexe 2**)

Le diagnostic moléculaire des espèces par PCR temps réel a confirmé que tous les isolats étaient de l'espèce *Plasmodium falciparum*.

III.2.2. Amplification gène *pfcr*

Pour le gène *pfcr* 113 échantillons soit 100% ont été amplifiés (**Figure 16**). Toutefois, il n'a été envoyé au séquençage que 80 échantillons. Ces échantillons ont été choisis d'une manière aléatoire.

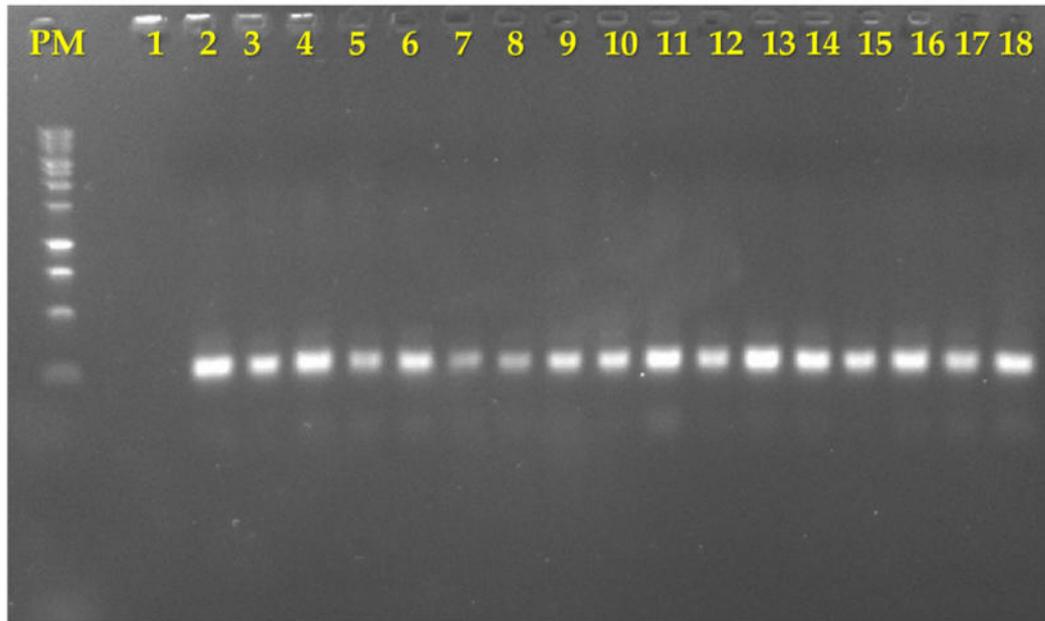


Figure 16 : Profil électrophorétique du gène *pfcr1*

PM = Marqueur de poids moléculaire (1kb)

1 = témoin négatif

2 = Témoin positif

3-18 = Échantillons amplifiés avec amorces *pfcr1* (*SecIF/SecIR*)

Taille amplicon = 241 pb

III.2.4. Séquençage

L'analyse de la CRT a montré 71 séquences lisibles. Le **Tableau VII** indique la distribution des mutations pures.

L'analyse de la CRT a montré que sur l'ensemble des 71 séquences lisibles, 68 contenaient les trois points de mutation *pfcr* **IET/IDT**. Les résultats ont mis en évidence 3/71 d'isolats *pfcr* sauvage M-74/N-75/K-76, 68 de mutants purs avec 66 d'isolats triple mutant M74I/N75E/K76T et 2 d'isolats triple mutants M74I/N75D/K76T (**Tableau VIII**).

La répartition de la fréquence des mutations des différents codons du gène *pfcr* est indiquée à la **figure 17**.

Tableau VII : Distribution des mutations pures du gène *pfcr*. Pour n=71

Position	Allèle	Effectif (%)
74	<u>I</u>	68 (95,77)
75	<u>E</u>	66 (92,96%)
	<u>D</u>	2 (2,82%)
76	<u>T</u>	68 (95,77)

Tableau VIII: Prévalence des génotypes du gène *pfcr*

Gène	Genotype	Effectif (n=71)	%
<i>Pfcr</i>	MNK	03	4,22
	<u>IET</u>	66	92,96
	IDT	2	2,82
	Total	71	100

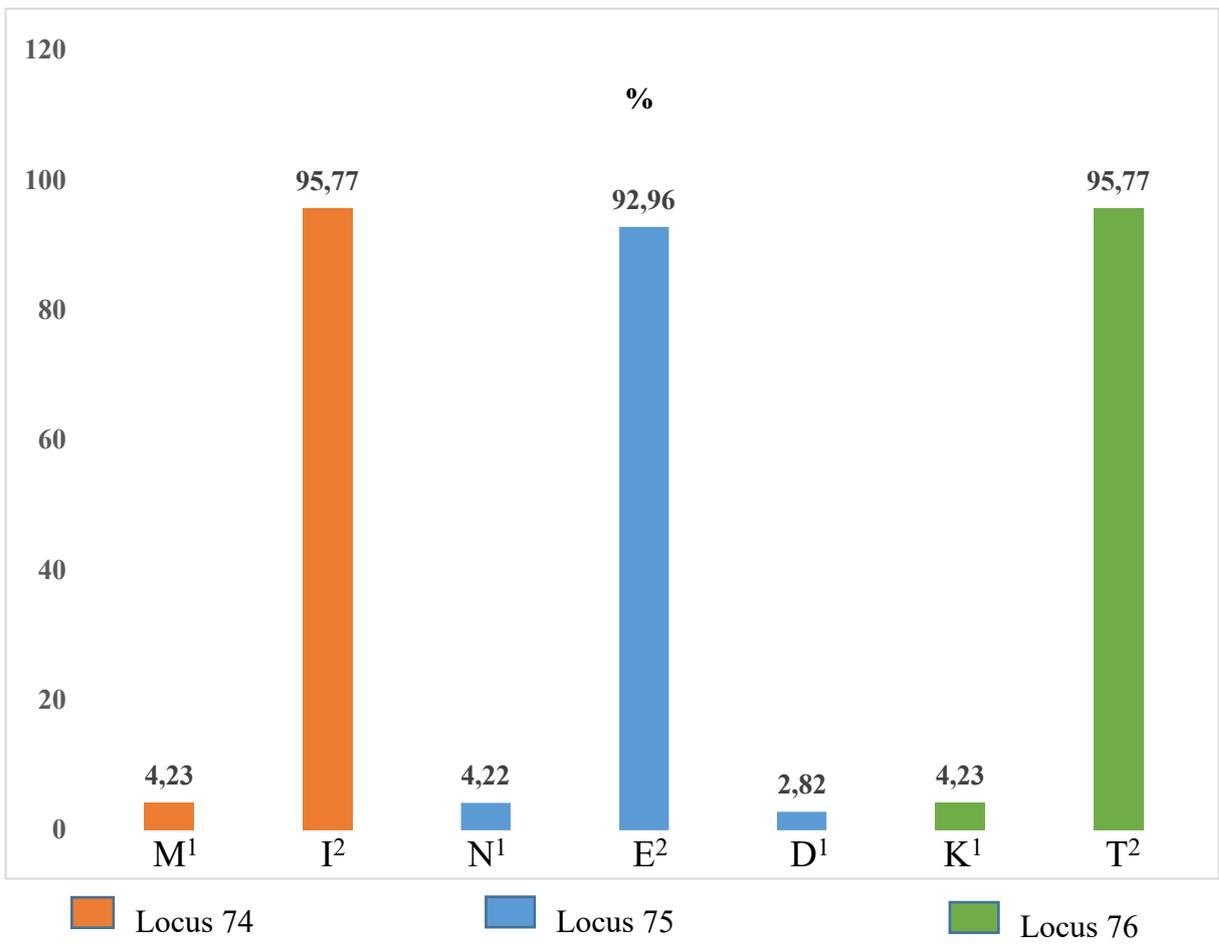


Figure 17 : Fréquence des mutations des codons du gene *pfert* des isolats de *P. falciparum*

¹ : Sauvage

² : Mutants

IV. DISCUSSION

Il s'est agi d'une étude visant à évaluer l'efficacité thérapeutique et l'innocuité des associations Artéméter/Luméfantine (AL) et Artésunate/Amodiaquine (ASAQ) dans la prise en charge du paludisme simple à *P. falciparum* au niveau du Centre de Santé de Massakory I. Ces deux CTA sont recommandés dans le traitement en première (ASAQ) et deuxième ligne (AL) du paludisme simple au Tchad. Depuis quelques années le PNLP du Tchad évalue régulièrement l'efficacité et la tolérance des deux associations dans le cadre de la surveillance de la résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques en particulier à l'artémisinine. Les résultats issus de ces différentes évaluations permettent au PNLP de disposer de données fiables et crédibles et de prendre par conséquent des décisions basées sur l'évidence. L'essai clinique a été couplé à une étude de polymorphisme du gène *pfcr1* dont le niveau de résistance permet d'évaluer indirectement le niveau de résistance aux CTAs.

Le site d'étude de Massakory a été choisi sur la base de l'endémicité du paludisme dans cette zone. La transmission du paludisme est continue et ne s'interrompt pratiquement pas tout le long de l'année. Pendant la saison sèche, Massakory et ses zones de responsabilités abritent beaucoup de marres véritables gîtes larvaires, ce qui expose ainsi la population aux piqûres infestantes des moustiques, principaux vecteurs de transmission du paludisme. Pendant la saison des pluies la formation des poches des eaux faisant suite à la pluviométrie et la rétention des eaux aux voisinages des habitations concourent également à ce mode de transmission.

A l'issue du test d'efficacité thérapeutique, les deux CTA ont présenté une Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate de 100%. Par conséquent tous les patients dans les deux groupes de traitement ont été déclarés guéris à l'issue des traitements. Les deux CTA, AL et ASAQ demeurent efficaces dans le traitement du paludisme simple dans le site d'étude. L'évaluation de l'efficacité CTA dans les pays voisins du Tchad a également montré une bonne efficacité de l'ASAQ et AL. Au Cameroun, Mbacham WF *et al.*, en 2010 ont trouvé des résultats similaires. Issa I *et al.* en 2020 au Niger ont trouvé des résultats montrant des RCPA respectives de 93,1 % et 94,1 % pour AL et ASAQ (Mbacham *et al.*, 2010). Au Nigéria, les travaux menés par Oguiche *et al.* en 2014 ont montré un taux de guérison élevé après correction PCR de 98,3% (Oguiche *et al.*, 2014). Avant correction PCR., le taux était de 97,4 %. Dans le reste de l'Afrique Sow D *et al.*, Ashley EA *et al.*, Takala H *et al.* ont attesté de l'efficacité constante des combinaisons AL et ASAQ avec des taux d'efficacité toujours supérieurs à 95 % (Ashley *et al.*, 2014; Takala-harrison & Laufer, 2015; Sow *et al.*, 2019). Au Mali, les travaux d'Ibrahim *et al.* en 2016 ont montré que la RCPA était respectivement de 94,8% pour AL et 97,1% pour ASAQ (Ibrahim, 2016). Falade *et al.* en 2014 ont rapporté aussi une RCPA avant et après correction PCR, de 92% et 95,9% respectivement pour AL et ASAQ (Venkatesan *et al.*, 2014). En Érythrée, une étude récente a montré un taux de guérison proche de 96 % à J28 (Salem *et al.*,

2017). Par contre Tinto H *et al.* 2014 et Sondo P *et al.* 2015 au Burkina Faso ont montré un taux de guérison faible à J28 de 77,8% et 84,1% respectivement pour l'ASAQ et l'AL (Tinto *et al.*, 2014; Sondo *et al.*, 2015). Cette dernière étude montre une diminution d'efficacité de ces deux molécules utilisées dans le traitement de première intention du paludisme simple et aussi justifier l'importance de la surveillance de ces deux molécules. Il est à noter qu'on assiste au cours de ces dernières années à une baisse de l'efficacité de l'AL si l'on tient compte des résultats provenant de divers TET. Plusieurs facteurs pourraient expliquer la diminution de l'efficacité de l'AL. Premièrement, elle pourrait être due au niveau plasmatique sous-thérapeutique du médicament et de l'immunité concomitante des patients. Les études pharmacocinétiques ont démontré que la variation interindividuelle de l'absorption et de l'élimination des CTA notamment l'AL, est très importante et a été liée aux résultats du traitement dans un certain nombre d'études (Antimalarial *et al.*, 2015; Kloprogge *et al.*, 2018). Deuxièmement, il pourrait s'agir d'une recrudescence due au fait que le patient n'a pas respecté la deuxième dose d'AL au cours des différents travaux, car cette deuxième dose n'était pas surveillée, car prise à la maison. Les patients peuvent ou non avoir pris les doses complètes d'AL. Troisièmement, l'AL doit être administré avec un repas gras pour une absorption efficace de la luméfantine. Cette indication n'a pas pu être respectée par le parent lors de la prise non surveillée. Quatrièmement, la recrudescence pourrait être considérée comme un développement de la résistance de *P. falciparum* à l'AL. La pression médicamenteuse, facteur de risque clé de la résistance de *P. falciparum*, pourrait expliquer cette baisse d'efficacité de l'AL ces dernières années. En effet, ce médicament est largement utilisé dans différents pays depuis plus de 20 ans. Malheureusement, il est souvent utilisé dans les cas présumés de paludisme malgré les directives des PNLP. En effet, de nombreux cas de fièvre sont traités comme des cas de paludisme sans confirmation diagnostique en dehors des structures de santé des pays.

En résumé, des facteurs tels que la concentration du médicament, la densité parasitaire avant le traitement, l'immunité spécifique au paludisme de l'hôte, indépendamment des effets intrinsèques liés au médicament, peuvent modifier ou augmenter les effets du médicament sur les parasites (Awasthi & Das, 2013; Witkowski *et al.*, 2013; Zwang *et al.*, 2014).

Bien qu'aucun échec à l'AL n'ait été observé dans notre travail il n'en demeure pas moins qu'il faut surveiller régulièrement l'efficacité de l'AL mais également de l'ASAQ.

Des études moléculaires et pharmacocinétiques couplées aux différents TET devraient être entreprises à l'avenir pour confirmer ou écarter une éventuelle résistance à l'artémisinine ou au médicament partenaire. La recrudescence des infections à *Plasmodium falciparum* dans une zone endémique à la suite de traitements à base de CTA a une implication dans le contrôle de la maladie. La surveillance continue de l'efficacité de l'AL et de l'ASAQ est cruciale pour

garantir que des réponses appropriées à tout déclin peuvent être mises en œuvre pour prolonger l'efficacité clinique de ce médicament antipaludique à long terme.

La clairance parasitaire dans ce travail a été de 48 heures en moyenne. Aucun retard de clairance parasitaire n'a été observé chez aucun patient dans les deux groupes de traitement.

Les résultats de Issa Ibrahima *et al* en 2020 au Niger ont montré une clairance parasitaire rapide dans les deux groupes 48 heures après la première dose (Ibrahima *et al.*, 2020). Seuls, 7 (8,9 %) patients dans le bras AL et 4 (5,3 %) dans le bras ASAQ présentaient une parasitémie résiduelle au deuxième jour sans différence significative ($p=0,55$). Ces données contrastent avec celles de Thanh *et al.*, en 2017 qui font état d'un taux de recrudescence inférieur à 3 % dans la sous-région (Thanh *et al.*, 2017). Les différences observées, ont pu avoir des effets sur la comparaison de l'efficacité, d'autant plus qu'il est rapporté dans la littérature que des facteurs comme l'âge, le niveau de parasitémie à l'admission ou le statut immunitaire peuvent, dans certains cas, influencer la clairance parasitaire (Nji *et al.*, 2015; Takala-Harrison & Laufer, 2015).

Un retard de clairance parasitaire après un traitement à l'artémisinine et des taux d'échec accrus après les traitements par CTA ont fourni des preuves définitives de la résistance en Asie du Sud-Est (Noedl *et al.*, 2008; Phyo *et al.*, 2012).

La méthode utilisée dans ce travail pour estimer la clairance parasitaire présente des limites. En effet la détermination de la clairance parasitaire sur la base d'une goutte épaisse toutes les 24 heures dans ces travaux manquent de précision car l'heure exacte de la quantification des parasites n'est pas enregistrée. De plus ce temps peut varier de plusieurs heures en fonction du moment de la visite sur le site d'étude à l'inclusion et pendant les jours de suivi. Des estimations précises des taux de clairance parasitaire avec le PCE de WWARN sont appropriées mais nécessitent des prélèvements fréquents (toutes les 6 heures ou 8 heures) difficiles à mettre en œuvre lors des TET. La proportion de patients présentant une parasitémie persistante au jour 3 après le traitement par CTA fournit un indicateur utile, à considérer comme simple et facilement mesurable dans le cadre d'études de surveillance de l'efficacité des médicaments. La clairance parasitaire retardée à 72 heures est un prédicteur *in vivo* de l'échec ultérieur avec les CTA et un indicateur de choix pour la surveillance de routine de la résistance présumée à l'artémisinine chez *P. falciparum*.

Des études antérieures ont déjà montré des cas de clairance parasitaire retardée, mais à un niveau inférieur à 5% (Offianan *et al.*, 2011; Toure *et al.*, 2014; Dagnogo *et al.*, 2018; Lingani *et al.*, 2020; Uwimana *et al.*, 2021). Le retard de clairance parasitaire constitue un indicateur précoce d'une diminution de l'efficacité voire d'une éventuelle résistance. Ceci devrait donc être une préoccupation pour le PNLP et les équipes de recherche afin de renforcer le suivi de

l'efficacité des CTA dans les pays d'endémie palustre. Une population parasitaire qui a été exposée aux médicaments antipaludiques, mais non complètement éliminée par ces derniers, a des implications pour le développement de la résistance de *P. falciparum* aux médicaments.

La clairance thermique dans cette étude a été de 48 heures en moyenne. Les travaux de Issa I et al en 2020 au Niger ont montré une baisse de la proportion de patients fébriles dans les deux bras après le premier jour de traitement, 7,6 % des patients du bras ASAQ et 9,2 % du bras AL étaient fébriles au deuxième jour du traitement mais la différence n'était pas significative ($p = 0,62$).

L'évaluation de la tolérance des deux CTA a montré dans ce travail que les événements indésirables étaient relativement plus fréquents dans le groupe ASAQ par rapport au groupe AL. Ils étaient composés essentiellement de douleurs abdominales et vomissements, suivis d'anorexie, d'asthénie et des toux. Toutefois aucun événement indésirable grave n'a été retrouvé dans aucun des groupes de traitement. Au Tchad Tchonfiene *et al.* en 2013 avaient observé les mêmes signes dominés par les vomissements (54,5%) dans le groupe ASAQ et aucun événement indésirable sévère n'a été également rapporté (Tchonfiene, **2013**). De même que Touré *et al.* en 2014 n'ont enregistré aucun effet indésirable sévère mais quelques signes décrits ci haut en occurrence l'asthénie, les douleurs abdominales et les vomissements sont respectivement dans 14%, 7% et 6% des cas (Toure *et al.*, **2014**). Ces effets indésirables correspondent aussi à ceux les plus fréquemment rencontrés lors du traitement avec les CTA et rapportés par plusieurs autres chercheurs (Leang *et al.*, **2015**; Nji *et al.*, **2015**; Thanh *et al.*, **2017**; Grandesso *et al.*, **2018**). En définitive les deux régimes thérapeutiques ont été bien tolérés.

La résistance de *Plasmodium falciparum* aux médicaments antipaludiques entrave les efforts visant à éradiquer le paludisme. La plus forte proportion d'isolats cliniques porteurs de l'allèle mutant Thr-76 du gène *pfcr* avait amené plusieurs pays dont le Tchad au retrait de la chloroquine en 2005. Il a été constaté l'utilisation informelle de la chloroquine dans la plupart des régions du Tchad dont la ville de Massakory. De nos jours aucune étude portant sur le polymorphisme du gène *pfcr* n'a été réalisée dans cette ville du Tchad (Anonyme, 2017).

L'analyse des 71 séquences lisibles sur les 80 échantillons séquencés, a indiqué une fréquence de 92,96% de génotypes IET.

Malgré la déclaration du gouvernement sur le retrait officiel de la chloroquine, Massakory fait partie des villes qui utilisent d'une manière informelle cette molécule d'où le maintien de la pression médicamenteuse. L'utilisation de la chloroquine pour le traitement du paludisme aurait entraîné une forte prévalence de ces souches mutantes dans cette ville car si son retrait avait été respecté il pourrait être accompagné d'une baisse ou diminution drastique de ces souches

mutantes comme l'ont rapporté Paul Sondo *et al.* en 2021 au Burkina Faso (Sondo *et al.*, **2021**). En effet lorsque la pression médicamenteuse diminue, la proportion de parasites sensibles augmente et celle des parasites résistants diminue (Kublin *et al.*, **2003**). Ce qui n'est pas le cas retrouvé lors de cette étude au Tchad.

Le gouvernement à travers le Ministère de la Santé Publique et de la Solidarité Nationale du Tchad doit renforcer la sensibilisation ou le lobbying en faveur d'un retrait effectif de la chloroquine. Une telle décision a été prise au Malawi où une réintroduction de la chloroquine pour la prévention et le traitement du paludisme est démontrée possible. En effet, le Malawi a été le premier pays africain à cesser d'utiliser la chloroquine en raison d'une résistance généralisée, moins d'une décennie après la suppression de la pression médicamenteuse, le marqueur moléculaire du paludisme résistant à la chloroquine avait disparu et le médicament s'est avéré avoir une excellente efficacité clinique (Ross *et al.*, **2018**).

Des récentes études réalisées dans des pays d'endémie palustre, avaient signalé la réémergence de parasites sensibles à la chloroquine dans des régions où il y a eu un retrait soutenu de la chloroquine, qui a principalement résulté de la ré-expansion du type sauvage après la suppression de la pression médicamenteuse. Il s'agit des travaux de Mwanza *et al.*, 2016 en Zambie qui avaient rapporté une prévalence de 100% de souches sensibles à la chloroquine (CVMNK) (Mwanza *et al.*, **2016**); Mekonnen *et al.*, 2016 en Ethiopie avec une fréquence des souches sensibles de 95,9% (Mekonnen *et al.*, **2014**). William *et al.*, 2015 au Kenya avaient aussi rapporté un déclin de prévalence de K76T à 41% après 13 ans d'arrêt d'utilisation officielle de la chloroquine (Kiarie *et al.*, **2015**).

Au Nigéria Ikegbumam *et al.* en 2019 ont rapporté 94,54% d'haplotype CVIET après analyse de 55 échantillons de *Plasmodium falciparum* (Ikegbumam *et al.*, **2019**). Cette forte prévalence s'expliquait par l'utilisation continue de la Chloroquine au Nigéria malgré son retrait décidé par le gouvernement. Massakory, un carrefour où l'approvisionnement en marchandises diverses et produits pharmaceutiques notamment la chloroquine se fait à partir du Nigéria. Ceci pourrait expliquer la possibilité d'approvisionnement en chloroquine de la population de Massakory. Oladipo *et al.* en 2015 ont également rapporté dans leurs travaux que 91,6 % (109/119) des enfants atteints d'une infection à *P. falciparum* hébergeaient des parasites avec l'haplotype *pfcr*t mutant CVIET contre 4,2 % de type sauvage (CVMNK) (Oladipo *et al.*, **2015**). Des résultats similaires ont été rapportés par Djaman *et al.* (Djaman *et al.*, **2010**). Les travaux récents de Dagnogo *et al.* (2020) en Côte d'Ivoire ont rapporté une prédominance de génotype MNK (type sauvage) avec une fréquence de 62% (Dagnogo *et al.*, **2020**). En revanche, des génotypes simples mutant, double mutant et triple mutant ont été observés avec des

prévalences respectives de 12%, 6% et 18%. La faible prévalence des mutants prouve le retrait effectif de la chloroquine de l'arsenal thérapeutique.

Selon Rovira Graels *et al.* (2012), il existerait des facteurs explicatifs liés à l'hôte à savoir le niveau de prémunition et la pharmacocinétique de la molécule de l'étude (Rovira-Graells *et al.*, **2012**). Le background génétique ainsi que l'alimentation pourraient être également des facteurs en cause de la variation des réponses thérapeutiques. Le faciès épidémiologique de la ville de Massakory, favoriserait et maintiendrait une importante pression anophélienne favorable à la circulation des souches résistantes comme rapporté par d'autres travaux (Nsango *et al.*, **2012**). En effet dans un environnement où la densité anophélienne est forte et dans lequel la pression médicamenteuse aux molécules usuelles telle que la chloroquine est élevée, le risque est grand que les piqûres infectantes transmettent les parasites portant les mutations de résistance.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Malgré les efforts consentis afin de l'éradiquer, le paludisme demeure un grave problème de santé publique. La prise en charge thérapeutique des cas de paludisme se heurte aujourd'hui à la résistance de *P. falciparum* aux dérivés de l'artémisinine et à leurs molécules partenaires notamment l'amodiaquine, la luméfantrine, la piperaquine. Il est important et nécessaire d'étudier l'émergence et la distribution de la résistance de *P. falciparum* à l'artémisinine et des molécules partenaires afin d'orienter les mesures de santé publique et une administration rationnelle au niveau des collectivités locales. 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.

L'objectif général du présent travail était d'une part d'évaluer l'efficacité thérapeutique des associations Artésunate-amodiaquine et Artémether- luméfantrine dans le traitement du paludisme simple à *P. falciparum* chez les enfants âgés de 6-59 mois dans le centre de santé de Massakory et d'autre part de déterminer le polymorphisme du gène *pfert*.

La première partie de ce travail s'était intéressée à l'efficacité thérapeutique de l'artésunate-amodiaquine et artémether-luméfantrine dans le traitement du paludisme simple à *Plasmodium falciparum* chez les enfants âgés de 6 à 59 mois. Les résultats ont montré une efficacité élevée pour ces deux molécules testées (ASAQ et AL), la réponse clinique et parasitologique adéquate (RCPA) était de 100%. Aucun retard des clairances thermiques et parasitologiques n'a été noté dans ce travail. En outre les deux associations ont été bien tolérées.

Les deux combinaisons thérapeutiques à base de dérivés d'artémisinine (CTA) notamment artémether-luméfantrine et artésunate-amodiaquine (AL et ASAQ) demeurent encore efficaces dans le traitement du paludisme simple dans le site d'étude.

La deuxième partie avait porté sur l'analyse moléculaire par séquençage du gène *pfert*. Les résultats de l'étude du polymorphisme du gène *pfert* a montré une prévalence de 92,96% du triple mutant **IET**. Cette forte prévalence témoigne de l'utilisation continue de la chloroquine dans la zone d'étude alors qu'elle est retirée de l'arsenal thérapeutique depuis 2005.

En définitive, cette étude a permis de générer des données cliniques et biologiques et de signaler l'existence des souches résistantes à la chloroquine à Massakory. Ces résultats interpellent les plus hautes autorités sanitaires du pays. Le gouvernement à travers le MSPSN et le PNLP, doivent renforcer la sensibilisation en faveur d'un retrait effectif de la chloroquine. Cette action va favoriser d'une part la réémergence de parasites sensibles à la chloroquine, et d'autre part rendre possible la réintroduction de la chloroquine dans le traitement du paludisme simple après la suppression de la pression médicamenteuse.

A la fin de ces travaux il serait souhaitable de :

- 1- Etudier le polymorphisme des gènes *K13-propeller*, *pfmdr1*, *dhps dhfr* en utilisant les extraits d'ADN conservés de la présente étude;
- 2- Cartographier les gènes de résistance *dhfr dhps*, *K13-propeller*, *pfcr1*, *pfmdr1* avec un échantillonnage plus grand sur des cassettes des TDR positifs , réalisés dans les différents centres de santé ;

RECOMMENDATIONS

Recommandations

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

Au Ministère de la Santé Publique et de la Solidarité Nationale (MSPSN)

- Procéder au rétrait définitif de la chloroquine sur toute l'étendue du territoire ;
- 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 et rendre disponible le fond spécial des TET.

Au Programme National de Lutte contre le Paludisme

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

A l'Organisation Mondiale de la Santé

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

Aux prestataires de soin

- Veillez à un bon diagnostic clinique du paludisme en séparant les formes graves des formes simples ;
- Veillez faire confirmer le diagnostic clinique par la GE et FS pour une prise en charge adéquate.

Aux populations

- Se présenter toujours à l'hôpital en cas de fièvre ou présence de signes cliniques évocateurs du paludisme ;
- Éviter l'automédication en respectant scrupuleusement la politique nationale de prise en charge.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Afoakwah, R., Boampong, J. N., Egyir-Yawson, A., Nwaefuna, E. K., Verner, O. N., & Asare, K. K. 2014. High prevalence of *pfprt* K76T mutation in *Plasmodium falciparum* isolates in Ghana. *Acta tropica*, **136**: 32–36.

Amaratunga, C., Neal, A. T., & Fairhurst, R. M. 2014. Flow cytometry-based analysis of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in the ring-stage survival assay. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **58**: 4938–4940.

Anonyme: Ministere de la Santé Publique du Tchad., 2017.- Enquête Nationale sur les indicateurs du paludisme au Tchad de 2017.

Anonyme: Ministère de la Santé Publique du Tchad., 2013.- Annuaire statistique. Tome A, 27ème Edition, Tchad.

Antimalarial W., Network R., Lumefantrine W., Pd P.K. & Group S., 2015.- Artemether-lumefantrine treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: a systematic review and meta-analysis of day 7 lumefantrine concentrations and therapeutic response using individual patient data. *BMC medicine*, **13**: 227.

Aretz, S., Stienen, D., Uhlhaas, S., Stolte, M., Entius, M. M., Loff, S., Back, W., Kaufmann, A., Keller, K. M., Blaas, S. H., 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, A. C., Khim, N., Kim, S., Duru, V., Bouchier, C., Ma, L., Lim, P., Leang, R., Duong, S., Sreng, S., Suon, S., Chhor, C. M., Bout, D. M., Ménard, S., Rogers, W. O., Genton, B., ... Ménard, D. 2014. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, **505**:50–55.

Asare K.K., Boampong J.N., Afoakwah R., Ameyaw E.O., Sehgal R. & Quashie N.B., 2014.- Use of proscribed chloroquine is associated with an increased risk of *pfprt* T76 mutation in some parts of Ghana, *Malaria Journal* **13**: 246.

Ashley, E. A., Dhorda, M., Fairhurst, R. M., Amaratunga, C., Lim, P., Suon, S., Sreng, S., Anderson, J. M., Mao, S., Sam, B., Sopha, C., Chhor, C. M., Nguon, C., Sovannaroeth, S., Pukrittayakamee, S., Jittamala, P., Chotivanich, K., Chutasmit, K., Suchatsoonthorn, C., Runchaoren, R., ... Tracking Resistance to Artemisinin Collaboration (TRAC). 2014. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *The New England journal of medicine*, **371**: 411–423.

- Awasthi, G., & Das, A. 2013.** Genetics of chloroquine-resistant malaria: a haplotypic view. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **108**: 947–961.
- Bacon, D. J., Latour, C., Lucas, C., Colina, O., Ringwald, P., & Picot, S. 2007.** Comparison of a SYBR 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, L. K., Eldin de Pécoulas, P., Wilson, C. M., 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.
- Briolant, S., Baragatti, M., Parola, P., Simon, F., Tall, A., Sokhna, C., Hovette, P., Mamfoumbi, M. M., Koeck, J. L., Delmont, J., Spiegel, A., Castello, J., Gardair, J. P., Trape, J. F., 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.
- Camara B., Kantambadouno J., Martin-Blondel G., Berry A., Alvarez M., Benoit V., J. Delmont , O. Bouchaud, B. Marchou , 2009.-** Hyper reactive malarial splenomegaly: three clinical cases and literature review. *Médecine et Maladies Infectieuses*, **39**: 29–45.
- CDC., 2020.-** Site internet CDC [WWW Document]. *url:// www.dpd.cdc.gov/dpdx* [accessed on 1st october 2021].
- Chahar M., Mishra N., Anvikar A., Dixit R. & Valecha N., 2017.-** Establishment and application of a novel isothermal amplification assay for rapid detection of chloroquine resistance (K76T) in *Plasmodium falciparum*. *Scientific reports*, **7**: 41119.
- Combrinck, J. M., Mabothe, T. E., Ncokazi, K. K., Ambele, M. A., Taylor, D., Smith, P. J., Hoppe, H. C., & Egan, T. J. 2013.** Insights into the role of heme in the mechanism of action of antimalarials. *ACS chemical biology*, **8**: 133–137.
- Coulibaly B., 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.

Dagnogo Oléfongo, Ako Aristide Berenger, Bla Kouakou Brice, Dago Dougba Noel, Coulibaly N'golo David, Coulibaly Baba, Touré Offianan André and Djaman Alico Joseph, 2020.- Assessing the polymorphism of *dhfr* gene from *Plasmodium falciparum* in the south of Cte d'Ivoire. *African Journal of Microbiology Research*, **14**: 158–165.

Dagnogo O., Ako A.B., Ouattara L., Dago N.D., Coulibaly D.N., Touré A.O. and Djaman A.J., 2018. Towards a re-emergence of chloroquine sensitivity in Côte d'Ivoire?. *Malaria Journal* **17**: 413

Dicko A., Konare M., Traore D., Testa J., Salamon R., Doumbo O., & Roger C., 2012.- The implementation of malaria intermittent preventive treatment with sulphadoxine-pyrimethamine in infants reduced all-cause mortality in the district of Kolokani, Mali: Results from a cluster randomized control. *Malaria Journal*, **11**:73.

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

Djaman J., Ahibo H., Yapi F., Bla B., Ouattara L., Yavo W. , 2010.- Molecular Monitoring of *Falciparum* Malaria Isolates in Côte d'Ivoire: Genetic Markers (*dhfr-ts*, *dhps*, *pfprt*, *pfmdr-1*) for Antimalarial-Drugs Resistance. *European Journal of Scientific Research*, **40**: 1216–1450.

DSIS., 2012.- Rapport annuel Division de Système d'Information Sanitaire (DSIS) du Tchad.

Eckstein-Ludwig U., Webb R.J., Goethem I.D.A. van, East J.M., Lee A.G., Kimura M., et al., 2003.- Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*, **424**: 957–961.

Marie-Thérèse Ekala, Nimol Khim, Eric Legrand, Milijaona Randrianariveolosia, Ronan Jambou5, Thierry Fandeur, Didier Menard, Serge-Brice Assi, Marie-Claire Henry, Christophe Rogier, Christiane Bouchier and Odile Mercereau-Puijalon. 2007.- Sequence analysis of *Plasmodium falciparum* cytochrome *b* in multiple geographic sites. *Malaria Journal*, **6**: 1–9.

Faye B., Ndiaye J., 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* **9**: 1–9.

Ferdig, M. T., Cooper, R. A., Mu, J., Deng, B., Joy, D. A., Su, X. Z., & Wellems, T. E. (2004). Dissecting the loci of low-level quinine resistance in malaria parasites. *Molecular microbiology*, **52**: 985–997.

- Fidock D., 2000.-** Mutations in the *P. falciparum* Digestive Vacuole Transmembrane Protein *pfcr* and Evidence for Their Role in Chloroquine Resistance. *Molecular Cell*, **6**: 861–871.
- Fidock D.A., Ecker A. & Lehane A.M., 2012.-** *pfcr* and its role in antimalarial drug resistance, *Trends in parasitology*, **28**: 504–514.
- Fivelman Q.L., Butcher G.A., Adagu I.S., Warhurst D.C. & Pasvol G., 2002.-** *Plasmodium falciparum* isolate from Lagos , Nigeria. *Malaria journal*, **4**: 1–4.
- Gaillard T., Sriprawat K., Briolant S., Wangsing C., Wurtz N., Baragatti M., Lavina M, Pascual A, Nosten F, Pradines B, 2015.-** Molecular Markers and *In Vitro* Susceptibility to Doxycycline in *Plasmodium falciparum* Isolates from Thailand. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **59**: 5080–5083.
- Gentilini M., 1993.-** *Médecine Tropicale*. 5th edn.
- Grandesso F., Guindo O., Messe L.W., Makarimi R., Traore A., Dama S., 2018.-** Efficacy of artesunate – amodiaquine , dihydroartemisinin – piperazine and artemether – lumefantrine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Maradi , Niger. *Malaria Journal*, **17**:1–9.
- Guillebaud J., Mahamadou A., Zamanka H., Katzelma M., Arzika I., Ibrahim M.L., 2013.-** Epidemiology of malaria in an area of seasonal transmission in Niger and implications for the design of a seasonal malaria chemoprevention strategy. *Malaria Journal*, **12**: 1–9.
- Hawley S.R., Bray P.G., Mungthin M., Atkinson J.D., O’Neill P.M. & Ward S.A., 1998.-** Relationship between antimalarial drug activity, accumulation, and inhibition of heme polymerization in *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42**: 682–686.
- Hay S.I., Guerra C.A., Gething P.W., Patil A.P., Tatem A.J., Noor A.M., Kabaria, C. W., Manh, B. H., Elyazar, I. R., Brooker, S., Smith, D. L., Moyeed, R. A., & Snow, R. W., 2009.-** A World Malaria Map : *Plasmodium falciparum* Endemicity in 2007. *PLoS medicine*, **6**: 3.e1000048
- Humphreys G.S., Merinopoulos I., Ahmed J., Whitty C.J.M., Mutabingwa T.K., Sutherland C.J, 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.E., 2009.-** Europe PMC Funders Group Exploring the folate pathway in *Plasmodium falciparum*, *Acta tropica*, **94**: 191–206.

- Ibrahim M., 2016.-** Comparison of the efficacy and safety of artemether-lumefantrine with artesunate-amodiaquine in Niger. *mali medical*, **31**:1-7
- Ibrahima I., Ibrahim M., Adehossi E., Mamane D., Boureima S., Harouna H., 2020.-** Safety and Efficacy of Artemether-Lumefantrine and Artesunate-Amodiaquine in Niger. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique (1990)*, **113**: 17–23.
- Ikegbunam M.N., Nkonganyi C.N., Thomas B.N., Esimone C.O., Velavan T.P. & Ojuronbe O., 2019.-** Analysis of *Plasmodium falciparum Pfprt* and *Pfmdr1* genes in parasite isolates from asymptomatic individuals in Southeast Nigeria 11 years after withdrawal of chloroquine. *Malaria Journal* **18**: 343
- Issa M. S., Kérah H. C., Mbaitouloum M. D., Ako A. B., Coulibaly B., Touré A. O., Djimadoum M., Tchoufiene P., Djimrassengar H., Yameogo V. J.M, Bouzid S., Ringwald., Dosso M. and Djaman A. J., 2017.-** Therapeutic Efficacy of Artesunate-Amodiaquine and Polymorphism of *Plasmodium falciparum k13-Propeller* Gene in Pala (Tchad). *International Journal Open Access Clinical Trials* 1:1-7
- Issa M., 2018.-** Efficacité thérapeutique de l'association artésunate amodiaquine 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), 180P.
- Ittarat I., Asawamahasakda W., Bartlett M.S., Smith J.W. & Meshnick S.R., 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*, **39**: 133–139.
- Kanya M.R., Yeka A., Bukirwa H., Lugemwa M., Rwakimari J.B., Staedke S.G., 2007.-** Artemether-Lumefantrine versus Dihydroartemisinin-Piperaquine for Treatment of Malaria : A Randomized Trial. *PLoS clinical trials*, **2**: 5
- Kérah H., 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), 185P
- Kiarie W.C., Wangai L., Agola E., Kimani F.T. & Hungu C., 2015.-** Chloroquine sensitivity : diminished prevalence of chloroquine - resistant gene marker *pfprt* - 76 13 years after cessation of chloroquine use in Msambweni , Kenya. *Malaria Journal* **14**: 320.

- Kim J., Tan Y.Z., Wicht K.J., Erramilli S.K., Dhingra S.K., Okombo J., 2019.-** Structure and drug resistance of the *Plasmodium falciparum* transporter *pfcr1*. *Nature*, **576**: 315–320.
- Kloprogge F., Workman L., Borrmann S., Te M., Lef G., Hamed K., Piola P., Ursing J., Kofoed P.E., 2018.-** Artemether-lumefantrine dosing for malaria treatment in young children and pregnant women : A pharmacokinetic- pharmacodynamic meta-analysis. *PLOS medicine*, **15**: 6.
- Kublin J.G., Cortese J.F., Njunju E.M., Mukadam R.A., Wirima J.J. & Kazembe P.N., 2003.-** Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. *Journal Infections Disease*, **187**: 1-5.
- Leang R., Bouth D.M., Song L., Tarning J., Char C., Kim S., 2015.-** Evidence of *falciparum* malaria multidrug resistance to artemisinin and piperazine in western Cambodia : dihydroartemisinin-piperazine open- label multicenter clinical assessment. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **59**: 4719-4726
- Lehane A.M. & Kirk K., 2010.-** Efflux of a range of antimalarial drugs and “chloroquine resistance reversers” from the digestive vacuole in malaria parasites with mutant *pfcr1*. *Molecular Microbiology*, **77**: 1039–1051.
- Lim P., Alker A.P., Khim N., Shah N.K., 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.
- Lingani M., Bonkian L.N., Yerbanga I., Kazienga A., Valéa I., Sorgho H., Ouédraogo, J. B., Mens, P. F., Schallig, H., Ravinetto, R., d'Alessandro, U., & Tinto, H., 2020.-** *In vivo* / *ex vivo* efficacy of artemether – lumefantrine and artesunate – amodiaquine as first-line treatment for uncomplicated *falciparum* malaria in children : an open label randomized controlled trial in Burkina Faso, *Malaria journal*, **19**: 8.
- Looareesuwan, S., Chulay, J. D., Canfield, C. J., & Hutchinson, D. B. 1999.** Malarone (atovaquone and proguanil hydrochloride): a review of its clinical development for treatment of malaria. Malarone Clinical Trials Study Group. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, **60**(4), 533–541.

- Bhattarai, A., Ali, A. S., Kachur, S. P., Mårtensson, A., Abbas, A. K., Khatib, R., Al-Mafazy, A. W., Ramsan, M., Rotllant, G., Gerstenmaier, J. F., Molteni, F., Abdulla, S., Montgomery, S. M., Kaneko, A., & Björkman, A. 2007.** Impact of artemisinin-based combination therapy and insecticide-treated nets on malaria burden in Zanzibar. *PLoS medicine*, **4**: 11.
- Malvy D., Djossou F., Thiebaut R. & Bras M. Le., 2000.-** Plasmodies - Malaria : Formes cliniques, diagnostic. *Maladies infectieuses*. **8**: 507-520.
- Mbacham W.F., Evehe M.B., Netongo P.M., Ateh I.A., Mimche P.N., Ajua A., Irene, D., Echouffo-Tcheugui, J. B., Tawe, B., Hallett, R., Roper, C., Targett, G., & Greenwood, B., 2010.-** Efficacy of amodiaquine , sulphadoxine- pyrimethamine and their combination for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in children in Cameroon at the time of policy change to artemisinin-based combination therapy, *Malaria journal*, **9**: 34.
- McGready R., Ashley E.A., 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.
- Mekonnen S.K., Aseffa A., Berhe N., Teklehaymanot T., Clouse R.M., Gebru T., Girmay M& Thirumalaisamy P., 2014.-** Return of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* parasites and emergence of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* in Ethiopia, *Malaria Journal*; **13**:244.
- Ménard D., Ariey F. & Mercereau-puijalon O., 2013.-** Série : le réseau international des Instituts Pasteur (1) Étude de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques au sein du réseau international des Instituts. *Medicine Sciences (Paris)*; **29** : 647–655
- Menard D. & Dondorp A., 2017.-** Antimalarial Drug Resistance : A Threat to Malaria Elimination, *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, **7**: 7.
- Ménard D., Khim N., Beghain J., Adegnika A.A., Shafiul-Alam M., Amodu O., ..., Barale J-C., Stokes B., Straimer J., Witkowski B., Fidock D.A., Rogier C., Ringwald P., Ariey F. and Mercereau-Puijalon O., 2016.-** A worldwide map of *Plasmodium falciparum* K13-propeller polymorphisms. *New England Journal of Medicine*, **374**: 2453–2464.
- Meshnick S.R., 2002.-** Artemisinin: Mechanisms of action, resistance and toxicity. *International Journal for Parasitology*, **32**: 1655–1660.

- Milton K., Edwards G., Ward S., Orme M. & Breckenridge A., 1989.**- Pharmacokinetics of halofantrine in man: effects of food and dose size. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **28**: 71–77.
- Miotto O., Amato R., Ashley A.E., MacInnis B., Almagro-Garcia J., Amaratunga C., Lim P., Mead D., Oyola O.S., Dhorda M., Imwong M., Woodrow C., Manske M., Stalker J., Drury E., Campino S., Amenga-Etego L., ..., Dondorp M.A., Chris C A Spencer C.A., McVean G., Fairhurst R.M., White J.N. & Dominic P Kwiatkowski D.P., 2015.** Genetic architecture of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*. *Nature Genetics* **47**: 226–234
- Moody A., 2002.**- Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clinical Microbiology Reviews*, **15**: 66–78.
- Murray C.K., Gasser R.A., Magill A.J. & Miller R.S., 2008.**- Update on rapid diagnostic testing for malaria. *Clinical Microbiology Reviews*, **21**: 97–110.
- Musset L., 2006.**- Résistance de *Plasmodium falciparum* à l'atovaquone - proguanil, 54. *Antimicrobiology Chemother* **57**:110-115
- Mutabingwa, T. K., Bolla, M. C., Li, J. L., Domingo, G. J., Li, X., Fried, M., & Duffy, P. E. 2005.** Maternal malaria and gravidity interact to modify infant susceptibility to malaria. *PLoS medicine*, **2**: 12.
- Mwanza, S., Joshi, S., Nambozi, M., Chileshe, J., Malunga, P., Kabuya, J. B., Hachizovu, S., Manyando, C., Mulenga, M., & Laufer, M. 2016.** The return of chloroquine-susceptible *Plasmodium falciparum* malaria in Zambia. *Malaria journal*, **15**: 584.
- Nambeole S.A., 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.
- Nessler S., Friedrich O., Bakouh N., Fink R.H.A., Sanchez C.P., Planelles G., 2004.**- Evidence for activation of endogenous transporters in *Xenopus laevis* oocytes expressing the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter, *pfert*. *Journal of Biological Chemistry*, **279**: 39438–39446.
- Nicholas K.B., Callaghan P. & Roepe P.D., 2013.**- Function of Resistance – Conferring *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter (*pfert*) Isoforms. *Biochemistry*, **52**: 4242–4249.

- Nji A.M., Ali I.M., Moyeh M.N., Ngongang E.O., Ekollo A.M., Chedjou J.P., Mbacham, W. F., 2015.-** Randomized non-inferiority and safety trial of dihydroartemisinin-piperaquine and artesunate-amodiaquine *versus* artemether-lumefantrine in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Cameroonian children. *Malaria Journal*, **14**: 1–10.
- Noedl H., Se Y., Schaecher K., Smith B.L., Socheat D. & Fukuda M.M., 2008.-** Evidence of artemisinin-resistant malaria in Western Cambodia. *New England Journal of Medicine*, **359**: 2619–2620.
- Nsango, S. E., Abate, L., Thoma, M., Pompon, J., Fraiture, M., Rademacher, A., Berry, A., Awono-Ambene, P. H., Levashina, E. A., & Morlais, I. 2012.** Genetic clonality of *Plasmodium falciparum* affects the outcome of infection in *Anopheles gambiae*. *International journal for parasitology*, **42**: 589–595.
- Offianan A.T., Assi S.B., Coulibaly A.M.A., N’guessan L.T., Ako A.A., Kadjo F.K., San M.K., Penali L.K. 2011.-** Assessment of the efficacy of first-line antimalarial drugs after 5 years of deployment by the National Malaria Control Programme in Côte d’Ivoire. *Open Access Journal of Clinical Trials*, **3**: 67–76.
- Oguche S., Okafor H.U., 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.
- Okech, B. A., Existe, A., Romain, J. R., Memnon, G., Victor, Y. S., de Rochars, M. B., & Fukuda, M. 2015.** Therapeutic efficacy of chloroquine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* in Haiti after many decades of its use. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, **92**: 541–545.
- Oladipo O.O., Wellington O.A. & Sutherland C.J., 2015.-** Persistence of chloroquine-resistant haplotypes of *Plasmodium falciparum* in children with uncomplicated Malaria in Lagos , Nigeria , four years after change of chloroquine as first-line antimalarial medicine. *Diagnostic pathology* ,**10**: 41.
- 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., 2019.-** World malaria report 2019. (<http://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2019/fr/>). Dernière consultation le 07 août 2020

Phuc, B. Q., Rasmussen, C., Duong, T. T., Dong, L. T., Loi, M. A., Ménard, D., Tarning, J., Bustos, D., Ringwald, P., Galappaththy, G. L., & Thieu, N. Q. 2017. Treatment Failure of Dihydroartemisinin/Piperaquine for *Plasmodium falciparum* Malaria, Vietnam. *Emerging infectious diseases*, **23**: 715–717.

Phyo AP, Nkhoma S, Stepniewska 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., Monbrison F. De, Bienvenu A.L., Price R.N. & 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**: 1–15.

Pina J.J. De, Garnotel E., Hance P., Vedy S., Rogier C. & Morillon M., 2007.-Diagnosis of imported malaria in France, *Medicine Malaria Infectiology*, **37**: 710–715.

Pradines B., Gendrot M., Delandre O., 2020. Implications des pompes membranaires de *Plasmodium falciparum* dans le transport et la résistance aux antipaludiques. *Revue Francophone des Laboratoires*. **519**: 1-8.

Prudêncio M., Rodriguez A. & Mota M.M., 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 N.J., 2004.- Therapeutic responses to antimalarial and antibacterial drugs in *vivax* malaria. *Acta Tropica*, **89**: 351–356.

Pulcini, S.; Staines, Henry M.; Lee, Andrew H.; Shafik, Sarah H.; Bouyer, Guillaume; Moore, Catherine M.; Daley, Daniel A.; Hoke, Matthew J.; Altenhofen, Lindsey M.; Painter, Heather J.; Mu, Jianbing; Ferguson, David J. P.; Llinas, Manuel; Martin, Rowen E.; Fidock, David A.; Cooper, Roland; and Krishna, Sanjeev. 2015. "Mutations in the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter, *pfcr*, enlarge the parasite's food vacuole and alter drug sensitivities". *Collected Faculty and Staff Scholarship*. **87**: 8

Ringwald P., Bickii J. & Basco L.K., 1999.- *in vitro* activity of dihydroartemisinin against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* in yaounde , cameroon, **61**: 187–192.

Rogier C., 2003.- Paludisme de l'enfant en zone d'endemie: Epidemiologie, acquisition d'une immunité et strategies de lutte; Childhood malaria in endemic areas: Epidemiology, acquired immunity and control strategies. *Médecine tropicale*, **63**: 16–449.

Ross L.S., Dhingra S.K., Mok S., Yeo T., Wicht K.J., Kumpornsin K., Takala-Harrison S., Witkowski B., Fairhurst R.M., Arley F., Menard D. and Fidock D.A., 2018.- Emerging Southeast Asian *pfert* mutations confer *Plasmodium falciparum* resistance to the first-line antimalarial piperazine. *Nature Communications* **9**: 25–28.

Rovira-Graells, N., Gupta, A. P., Planet, E., Crowley, V. M., Mok, S., Ribas de Pouplana, L., Preiser, P. R., Bozdech, Z., & Cortés, A. 2012. Transcriptional variation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Genome research*, **22**: 925–938.

Salem M., Ahmedou O., Lekweiry K.M., Bouchiba H., Pascual A., Pradines B., Salem B., Briolant S., Leonardo K. and Hervé B., 2017.- Characterization of *Plasmodium falciparum* genes associated with drug resistance in Hodh Elgharbi , a malaria hotspot near Malian – Mauritanian border. *Malaria Journal* **16**: 1–9.

Sayang C., Soula G., Tahar R., Basco L.K., Gazin P., Moyou-Somo R., et al., 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.

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 Out patients in a Peripheral Health Facility in Yaoundé, Cameroon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **81**: 343-347

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

Sidhu A.B.S., Verdier-Pinard D. & David A. Fidock., 2002.- Chloroquine Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria Parasites Conferred by *pfert* Mutations. *National institutes of health*, **298**: 210–213.

Singer V.L., Jones L.J., Yue S.T. & Haugland R.P., 1997.- Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence- based solution assay for double-stranded DNA quantitation. *Analytical Biochemistry*, **249**: 228–238.

Singh Sidhu A.B., Verdier-Pinard D. & Fidock D.A., 2002.- Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by *pfert* mutations. *Science*, **298**: 210–213.

Snounou, G., Viriyakosol, S., Zhu, X. P., Jarra, W., Pinheiro, L., do Rosario, V. E., Thaithong, S., & Brown, K. N. 1993. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular and biochemical parasitology*, **61**: 315–320.

Sondo, P., Bihoun, B., Kabore, B., Tahita, M. C., Derra, K., Rouamba, T., Diallo, S. N., Kazienga, A., Ilboudo, H., Valea, I., Tarnagda, Z., Sorgho, H., Lefevre, T., & Tinto, H. 2021. Polymorphisme de *Plasmodium falciparum* et mutations des gènes de résistance *Pfprt* et *Pfmdr1* dans la zone de Nanoro, Burkina Faso [Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* parasites and mutations in the resistance genes *Pfprt* and *Pfmdr1* in Nanoro area, Burkina Faso]. *The Pan African medical journal*, **39**: 1-18.

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 artésunate-amodiaquine, dihydroartémisinine-pipéraquline et artéméter luméfantrine pour le traitement du paludisme à *Plasmodium falciparum* non compliqué au Sénégal. *Médecine et Sante Tropicales*, **26** : 45-50

Sridaran S., McClintock S.K., Syphard L.M., Herman K.M., Barnwell J.W. & 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. *Malaria Journal*, **9**: 1–22.

Sugioka Y. & Suzuki M., 1991.- The chemical basis for the ferriprotoporphyrin IX-chloroquine complex induced lipid peroxidation. *BBA - General Subjects*, **1074**: 19–24.

Takala-harrison S. & Laufer M.K., 2015.- Antimalarial drug resistance in Africa : key lessons for the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1342**: 62–67.

Takala-Harrison S. & Laufer M.K., 2015.- Antimalarial drug resistance in Africa: Key lessons for the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1342**: 62–67.

Tamez P.A., 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.

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.

Thanh N.V., Nhien N.T., Thi N., Tuyen K., Tong N.T., Thuy N., Dong L.T, Quang H.H., Farrar J., Thwaites G., White N.J., Wolbers M. and Hien T.T., 2017.- Rapid decline in the susceptibility of *Plasmodium falciparum* to dihydroartemisinin – piperazine in the south of Vietnam. *Malaria Journal*, **16**: 1–10.

Tinto H., Bonkian L.N., Nana L.A., Yerbanga I., Lingani M., Kazienga A., ...D'Alessandro, U. 2014. Effectiveness of artesunate-amodiaquine vs. artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated *falciparum malaria* in Nanoro, Burkina Faso: a non-inferiority randomised trial. *Tropical Medicine & International Health*, **19**: 469–475

Toure A. O., 2011.- Traitement préventif intermittent chez la femme enceinte et chimiorésistance de *P.falciparum* en Côte d'Ivoire. *Open Access Journal Clinical Trials*. **3**: 67-76.

Toure, O. A., Assi, S. B., N'Guessan, T. L., Adjii, G. E., Ako, A. B., Brou, M. J., Ehouman, M. F., Gnamien, L. A., Coulibaly, M. A., Coulibaly, B., Beourou, S., Bassinka, I., Soumahoro, A., Kadjo, F., & Tano, M. A. 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**: 43-49.

Trape J.F., 2001.- The public health impact of chloroquine resistance in Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **64**: 12–17.

Uwimana A., Umulisa N., Venkatesan M., Szigel S.S., Zhou Z., Munyaneza T., 2021.- Association of *Plasmodium falciparum kelch13 R561H* genotypes with delayed parasite clearance in Rwanda: an open-label, single-arm, multicentre, therapeutic efficacy study. *The Lancet Infectious Diseases*, **21**: 1120–1128.

Vaidya A.B., Lashgari M.S., Pologe L.G. & Morrisey J., 1993.- Structural features of *Plasmodium cytochrome b* that may underlie susceptibility to 8-aminoquinolines and hydroxynaphthoquinones. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **58**: 33–42.

Venkatesan, M., Gadalla, N. B., Stepniwska, K., Dahal, P., Nsanzabana, C., Moriera, C., Price, R. N., Mårtensson, A., Rosenthal, P. J., Dorsey, G., Sutherland, C. J., Guérin, P., Davis, T., Ménard, D., Adam, I., Ademowo, G., Arze, C., Baliraine, F. N., Berens-Riha, N., Björkman, A., ... Asaq Molecular Marker Study Group. 2014. Polymorphisms in

Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter and multidrug resistance 1 genes: parasite risk factors that affect treatment outcomes for *P. falciparum* malaria after artemether-lumefantrine and artesunate-amodiaquine. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, **91**: 833–843.

Wang P., Read M., Sims P.F.G. & Hyde J.E., 1997.- Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilization. *Molecular Microbiology*, **23**: 979–986.

White N.J., Pongtavornpinyo W., Maude R.J., Saralamba S., Aguas R., Stepniewska K., 2009.- Hyperparasitaemia and low dosing are an important source of anti-malarial drug resistance. *Malaria Journal*, **8**: 756-765.

Witkowski B., Amaratunga C., Khim N., Sreng S., Chim P., Kim S., 2013.- Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: In-vitro and ex-vivo drug-response studies. *The Lancet Infectious Diseases*, **13**: 1043–1049.

Yap, N. J., Hossain, H., Nada-Raja, T., Ngui, R., Muslim, A., Hoh, B. P., Khaw, L. T., Kadir, K. A., Simon Divis, P. C., Vythilingam, I., Singh, B., & Lim, Y. A. 2021. Natural Human Infections with *Plasmodium cynomolgi*, *P. inui*, and 4 other Simian Malaria Parasites, Malaysia. *Emerging infectious diseases*, **27**: 2187–2191.

Yeka A., Dorsey G., Kanya M.R., Talisuna A., Lugemwa M., Bosco J., 2008.- Artemether-Lumefantrine *versus* Dihydroartemisinin- Piperaquine for Treating Uncomplicated Malaria : A Randomized Trial to Guide Policy in Uganda, *PloS one*, **3**: 1-6.

Zwang J., Dorsey G., Mårtensson A., D’Alessandro U., Ndiaye J.L., Karema C., 2014.- *Plasmodium falciparum* clearance in clinical studies of artesunate- amodiaquine and comparator treatments in sub-Saharan Africa, 1999-2009. *Malaria Journal*, **13**: 3–13.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Autorisation du Ministère

REPUBLIQUE DU TCHAD ***** PRESIDENCE DE LA REPUBLIQUE ***** MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR, DE LA RECHERCHE ET DE L'INNOVATION ***** DIRECTION GENERALE DU MINISTERE ***** DIRECTION GENERALE TECHNIQUE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR, DE LA RECHERCHE ET DE L'INNOVATION ***** DIRECTION DE LA RECHERCHE ET DE L'INNOVATION	UNITE - TRAVAIL - PROGRES ***** وحدة - عمل - تقدم 	جمهورية تشاد ***** رئاسة الجمهورية ***** رئاسة الوزراء ***** وزارة التعليم العالي والبحث والابتكار ***** امانة الدولة في التعليم العالي والبحث والابتكار ***** الامانة العامة *****
---	--	--

N° 0116 /PR/MESRI/DGM/DGESRI/DRI/2019

N'Djaména, le 29 octobre 2019

AUTORISATION DE RECHERCHE

Dans le cadre des travaux de recherche sur la lutte contre le paludisme, les enseignants-chercheurs dont les noms suivent sont autorisés à se rendre dans les Provinces du Chari Baguirmi, Hadjer-Lamis et Kanem du 02 novembre 2019 au 02 février 2020. Il s'agit de :

- Mahamat Moussa Hassane Taisso
- Issa Mahamat Souleymane

Il est demandé aux autorités administratives, militaires et traditionnelles de ces Provinces de bien vouloir leur faciliter la tâche.

Les intéressés doivent se soumettre aux consignes de sécurité des Gouverneurs.

La Direction de la Recherche et de l'Innovation attend de ces derniers un rapport à la fin de leur mission.

Cette autorisation de recherche est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Le Directeur de la Recherche et de l'Innovation

Ampliation :

- MESRI
- DGESRI

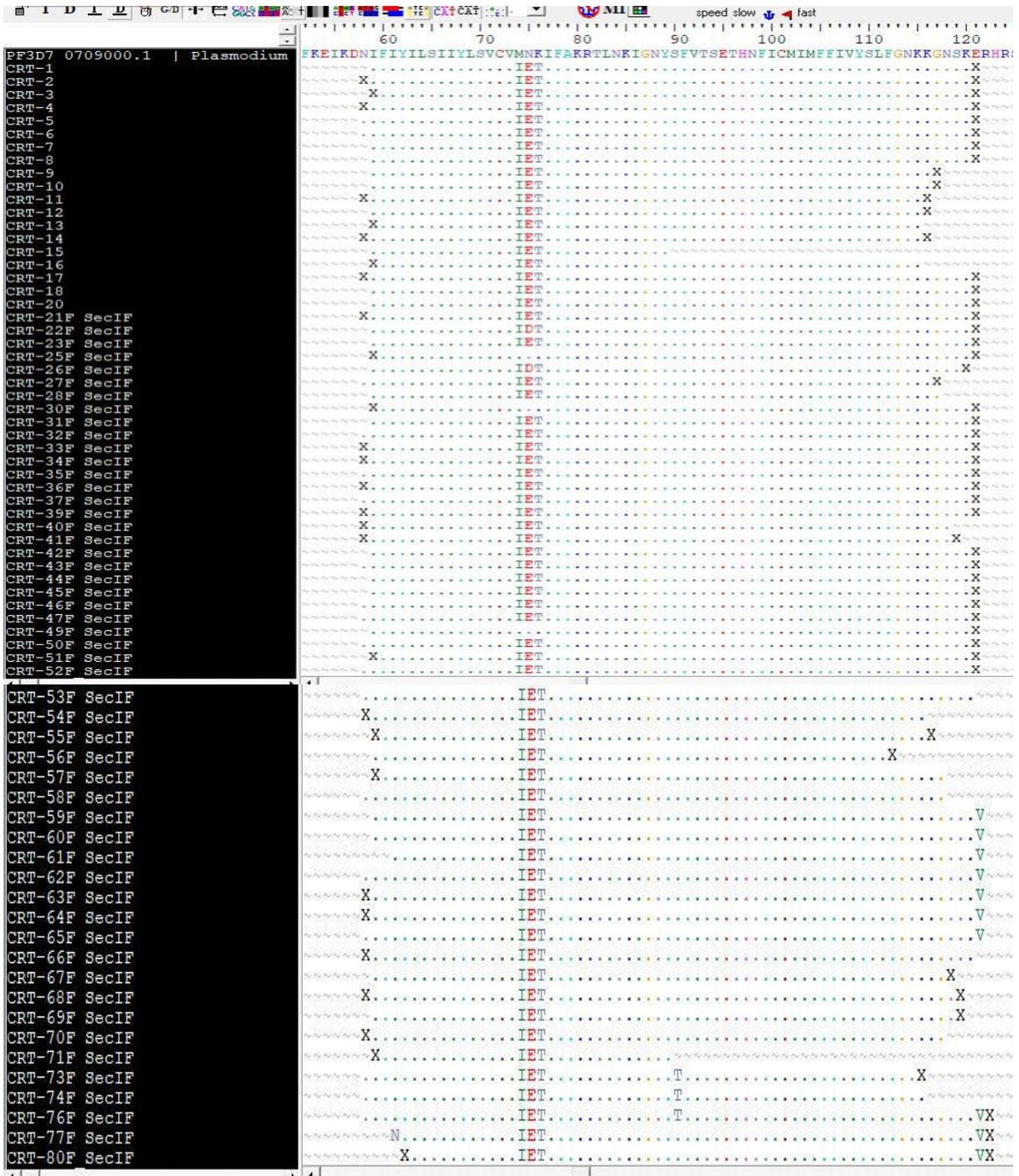



Dr ZAKINET DANGBET

ANNEXE 2 : Densité optique des échantillons de notre étude

Id échantillon	Acide nucléique (ng/uL)	Id échantillon	Acide nucléique (ng/uL)
Échantillon 1	5,296	Échantillon 41	6,945
Échantillon 2	8,926	Échantillon 42	5,046
Échantillon 3	6,562	Échantillon 43	8,561
Échantillon 4	7,93	Échantillon 44	7,564
Échantillon 5	15,056	Échantillon 45	5,278
Échantillon 6	10,045	Échantillon 46	5,584
Échantillon 7	8,608	Échantillon 47	7,924
Échantillon 8	13,357	Échantillon 48	4,896
Échantillon 9	14,864	Échantillon 49	9,255
Échantillon 10	7,462	Échantillon 50	6,648
Échantillon 11	10,622	Échantillon 51	8,11
Échantillon 12	7,418	Échantillon 52	11,048
Échantillon 13	10,127	Échantillon 53	5,957
Échantillon 14	14,365	Échantillon 54	6,233
Échantillon 15	0,159	Échantillon 55	6,604
Échantillon 16	13,901	Échantillon 56	7,426
Échantillon 17	10,841	Échantillon 57	6,544
Échantillon 18	11,836	Échantillon 58	7,063
Échantillon 19	0,891	Échantillon 59	6,602
Échantillon 20	19,131	Échantillon 60	6,322
Échantillon 21	7,925	Échantillon 61	8,114
Échantillon 22	7,346	Échantillon 62	7,725
Échantillon 23	4,585	Échantillon 63	10,126
Échantillon 24	7,537	Échantillon 64	8,139
Échantillon 25	11,025	Échantillon 65	9,623
Échantillon 26	9,077	Échantillon 66	5,796
Échantillon 27	14,56	Échantillon 67	7,15
Échantillon 28	22,654	Échantillon 68	7,328
Échantillon 29	5,867	Échantillon 69	9,122
Échantillon 30	4,65	Échantillon 70	9,525
Échantillon 31	3,479	Échantillon 71	13,647
Échantillon 32	5,294	Échantillon 72	9,207
Échantillon 33	5,1	Échantillon 73	10,562
Échantillon 34	6,628	Échantillon 74	10,344
Échantillon 35	4,503	Échantillon 75	5,589
Échantillon 36	15,272	Échantillon 76	8,962
Échantillon 37	10,821	Échantillon 77	7,09
Échantillon 38	6,472	Échantillon 78	10,782
Échantillon 39	11,256	Échantillon 79	6,945
Échantillon 40	9,416	Échantillon 80	5,046
Moyenne	8,58	Maximum	22,654
		Minimum	0,159

ANNEXE 3 : Aligement des séquences obtenues au cours de cette étude avec une souche sauvage de référence



CALENDRIER DES ACTIVITES DE SUIVI

	Jour								
	0	1	2	3	7	14	21	28	Autre jour
Procédure									
Évaluation clinique	X	X	X	X	X	X	X	X	(X)
Température	X	X	X	X	X	X	X	X	
Goutte épaisse pour la numération parasitaire	X	X	X	X	X	X	X	X	(X)
Prélèvement sanguin :									
Génotypage	X				X	X	X	X	(X)
Marqueurs moléculaires	(X)				(X)	(X)	(X)	(X)	(X)
Traitement									
Médicament à tester	X	(X)	(X)						
Traitement de secours		(X)							

Les parenthèses indiquent des activités effectuées uniquement dans certains cas ou des activités facultatives. Par exemple, le traitement ne sera donné aux jours 1 et 2 que pour des médicaments exigeant une administration sur trois jours. Au jour 1, il conviendra de rechercher une parasitémie si le patient présente un signe quelconque de danger, ou la courbe de décroissement parasitaire doit être calculée. Le traitement de secours pourra être administré n'importe quel jour, à condition que le patient réponde aux critères d'échec thérapeutique. Les jours supplémentaires sont tous les jours où le patient revient au centre de santé, autres que les jours de suivi programmés, en raison d'une récurrence des symptômes. Ces jours-là, des prélèvements sanguins pourront être effectués de manière systématique ou à la demande du personnel clinique.

PUBLICATIONS

Effectiveness and Tolerability of the ASAQ versus AL Association in Children 6-59 Months for the Treatment of Uncomplicated *P. falciparum* Malaria in Massakory (Chad)

Mahamat Moussa Hassane Taïso^{1, 2, *}, Issa Mahamat Souleymane³, Hamit Mahamat Alio¹, Mahamat Saleh Issakha Diar³, Djiddi Ali Sougoudi⁴, Djimadoum Mbanga¹, Pascal Ringwald⁵, Djimrassengarh Honoré⁶, Issa Ali Hagggar⁴, Hassoumi Manah⁴, Hassan Ahmat Mihedi³, N'garadoum Olivier³, David Koffi², Offianan André Touré², Djaman Allico Joseph²

¹Faculty of Science and Human Health, University of N'Djamena, N'Djamena, Chad

²Department of Parasitology Mycology, Institute Pasteur, Abidjan, Côte d'Ivoire

³Chad National Malaria Control Program, N'Djamena, Chad

⁴Ministry of Health, Public and Human Solidarity, N'Djamena, Chad

⁵World Health Organization, Geneva, Switzerland

⁶World Health Organization, N'Djamena, Chad

Email address:

taïssomahamat@gmail.com (M. M. H. Taïso), taïssomahamat@icloud.com (M. M. H. Taïso), Issa.mahamatsoul@gmail.com (I. M. Souleymane), hamitalio@yahoo.fr (H. M. Alio), Saleh_diar@yahoo.fr (M. S. I. Diar), Sidimi1977@yahoo.fr (D. A. Sougoudi), djimbanga@yahoo.fr (D. Mbanga), Ringwaldp@who.int (P. Ringwald), djimrassengarh@who.int (D. Honoré), Issahagggar20@gmail.com (I. A. Hagggar), Hassoumimanah20@gmail.com (H. Manah), Aboulhous2000@gmail.com (H. A. Mihedi), ngaradoumolivier@gmail.com (N. Olivier), davidkoffi82@gmail.com (D. Koffi), Andre_offianan@yahoo.fr (O. A. Touré), djamanj@yahoo.fr (D. A. Joseph)

*Corresponding authors

To cite this article:

Mahamat Moussa Hassane Taïso, Issa Mahamat Souleymane, Hamit Mahamat Alio, Mahamat Saleh Issakha Diar, Djiddi Ali Sougoudi, Djimadoum Mbanga, Pascal Ringwald, Djimrassengarh Honoré, Issa Ali Hagggar, Hassoumi Manah, Hassan Ahmat Mihedi, N'garadoum Olivier, David Koffi, Offianan André Touré, Djaman Allico Joseph. Effectiveness and Tolerability of the ASAQ versus AL Association in Children 6-59 Months for the Treatment of Uncomplicated *P. falciparum* Malaria in Massakory (Chad). *American Journal of Biomedical and Life Sciences*. Vol. 9, No. 5, 2021, pp. 259-266. doi: 10.11648/j.ajbls.20210905.16

Received: September 23, 2021; Accepted: October 13, 2021; Published: October 21, 2021

Abstract: *Background and Objective:* Artemisinin-based combination therapies are the first-line antimalarial drugs used to treat uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in many endemic countries worldwide. This study was conducted to assess the efficacy and tolerability of two fixed-dose formulations of artesunate-amodiaquine and artemether-lumefantrine for the treatment of *Plasmodium falciparum* malaria in Chad. *Methodology and Results:* A two-arm single cohort study was conducted assessing the efficacy artesunate-amodiaquine and artemether-lumefantrine for the treatment of children with uncomplicated falciparum malaria. This study was carried out from December 14, 2019 to March 14, 2020 at the Massakory I Health Center in Chad. Primary efficacy endpoint was day 28, parasitological cure rate. Secondary endpoints were parasite and fever clearance times and tolerability. A total of 113 patients were included, including 56 in the artesunate-amodiaquine arm and 57 in the artemether-lumefantrine arm. In intention to treat these patients, the Adequate Clinical and Parasitological Response on day 28 were 100% for the two groups. No early treatment failure was observed. The drugs were well tolerated and no serious adverse events were noted. *Conclusion:* Both forms of Artemisinin-based combination therapy were still effective and safe in the treatment of uncomplicated *P. falciparum* malaria in Chad. Further studies are warranted in different regions of Chad for monitoring of drug resistance.

Keywords: Simple Malaria, Artésunate-Amodiaquine, Artemether-Lumefantrine, *Plasmodium falciparum*, Massakory, Chad

1. Introduction

Malaria remains an important public health problem in tropical and subtropical countries. It is estimated that there were 216 millions clinical cases of malaria and around 445,000 deaths in 2016, of which nearly 92% were in Africa, according to data from the World Health Organization [1]. Almost 85% of malaria deaths worldwide in 2018 were concentrated in 20 countries in the WHO Africa region and India. Nigeria alone accounted for nearly 24% of these deaths, followed by the Democratic Republic of the Congo (11%), the United Republic of Tanzania (5%), as well as Angola, Mozambique and Niger (4% each). It is estimated that nearly 24 millions children in sub-Saharan Africa suffered from *P. falciparum* malaria infections in 2018.

Since then, great strides have been made to reduce malaria-related morbidity and mortality. Artemisinin-based combination therapy (ACT) has been recommended for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in almost all areas, as recommended by the WHO, since the emergence and spread of multidrug-resistant strains of *Plasmodium falciparum* [2]. ACT combines a fast-acting but rapidly eliminated artemisinin derivative with a long-lasting partner drug. Artesunate-Amodiaquine (ASAQ) and Artemether-Lumefantrine (AL) are the first-line drugs for uncomplicated *P. falciparum* malaria in Africa. ACT therapy indeed shows high efficacy, but clinical resistance to artemisinin, manifested by delayed parasite clearance, was first reported in Pailin, western Cambodia in 2009 [3], this resistance has

spread to all the countries of the Greater Mekong sub-region [4, 5]. The presence of resistance to Artemisinin partner drugs has caused treatment failure with Piperaquine (DHA-PPQ), AL, etc. [4, 6, 7].

Therefore, it is important and necessary to study the emergence and distribution of artemisinin and partner drug resistance in order to guide public health measures and rational administration at the level of local communities. Protecting the effectiveness of recommended treatments for malaria is a top priority for malaria-endemic countries as well as the global malaria control community.

In Chad, since the adoption of ACTs in its first-line treatment policy for uncomplicated malaria in 2005, Artemether-Lumefantrine and Artesunate-Amodiaquine have been widely used. WHO recommends that all countries regularly monitor the emergence or spread of resistant parasites. Therapeutic efficacy studies remain the gold standard for guiding drug policy. Regular performance of Therapeutic Effectiveness Tests (TET) every two years, coupled with molecular studies, is an effective way to monitoring drug resistance in endemic countries. This study was conducted to assess the efficacy and tolerability of two fixed-dose formulations of ACT, Artesunate-Amodiaquine and Artemether-lumefantrine for the treatment of *P. falciparum* malaria in Chad. This study shows that they are effective for the treatment of uncomplicated malaria with the Adequate Clinical and Parasitological Response which was 100% in both groups.

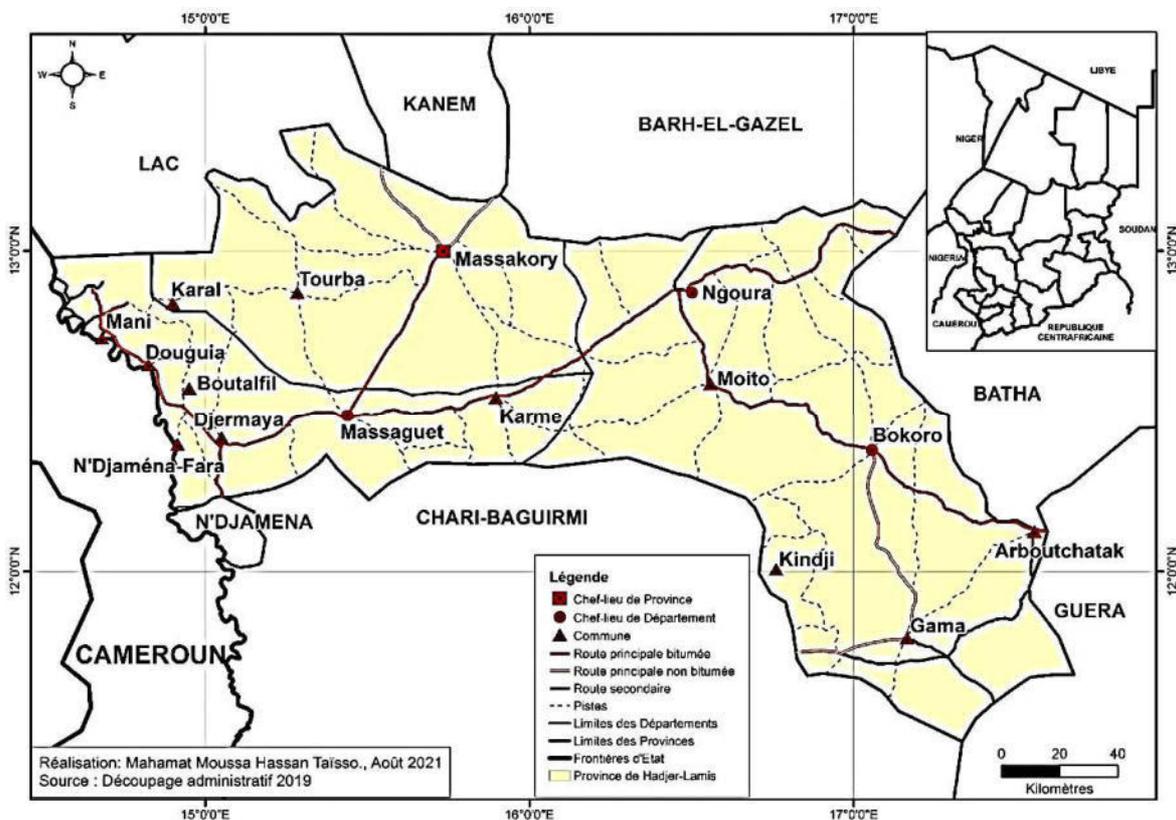


Figure 1. Map of Massakory, Chad.

2. Materials and Methods

2.1. Type, Period and Study Location

This was a two-arm single cohort study (ASAQ-AL). The patients are split into two groups corresponding to the two molecules tested. After the medication is drawn, a unique code is assigned to each patient until discharge (D28). The study was carried out from December 14, 2019 to March 14, 2020 at the Massakory I Health Center (Maplink Latitude: 13.0016804 Longitude: 15.7286011), located in the city of Massakory about 160 km at the North exit from N'Djamena (figure 1). Massakory is the capital of the Province of Hadjer Lamis and department of Dagana. The Center covers an area of responsibility with 46 rural villages and 9 urban districts, the number of the population is estimated at 15,122 in 2015. The number of monthly consultations varies from 1,000 to 2,500 respectively in the dry and rainy seasons.

2.2. Target Population of the Study

The study focused on patients with uncomplicated *P. falciparum* malaria, aged 6 to 59 months, who came for consultation at the Massakory health center and who had met the criteria for inclusion of the protocol. This age group is often vulnerable to all diseases, especially malaria because of their weak immune system. This group provides a better appreciation of the therapeutic efficacy of ASAQ and AL.

2.3. Procedure and Sample Collection

The population of this study was infant aged to 6-59

months, and presenting with acute, symptomatic, uncomplicated *P. falciparum* malaria. They were recruited according to the WHO inclusion criteria (absence of severe malnutrition, axillary temperature of $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$ or history of fever in the last 24 hours, asexual *P. falciparum* density 2,000-200,000/ μL , and ability to swallow oral medication), and exclusion criteria (severe vomiting, history or evidence of clinically systematic significant disorders, other febrile conditions, hypersensitivity or adverse reactions to anti-malarial, history of use of any other anti-malarial agent within four weeks prior to start of the study). Subject informed consent was requested prior the study. Subjects who withdrew early were not replaced. Eligible subjects were blindly, randomly assigned equally to one of the two treatment groups (ASAQ-AL).

ASAQ₁ manufactured by SANOFI (batch number 8MA127, expiration date 01/01/2021) is dosed as 25 mg Artesunate / 67.5 mg Amodiaquine body weight for infants (3-11 months) and ASAQ₂ (Batch number 8MA153, expiration date 01/01/2020) is dosed in 50 mg Artesunate / 135 mg Amodiaquine for small children (3-5 years). ASAQs were prescribed based on the child's body weight once a day for 3 days.

AL is manufactured by CILPA (batch number B / NID73883, expiration date 09/01/2020), is dosed in 20 mg Artemether / 120 mg Lumefantrine. The treatment was administered twice a day for three days. All medication taken under the supervision of the doctor for possible side effects. (The dosage is given in the following table 1).

Table 1. ASAQ and AL dosing regimen.

Body weight (age)	Day 0	Day 1	Day 2
Artesunate-Amodiaquine (ASAQ)			
5 to 9 kg (<3 years)	1 tab 2x / day	1 tab 2x / day	1 tab 2x / day
9 to 18 kg ($\geq 3 - 8$ years)	2 tab *	2 tab *	2 tab *
Artemether-Lumefantrine (AL)			
5 to 15 kg (<3 years)	1 tab x 2 / day	tab 2x / day	1 tab 2x / day
15 to 25 kg ($\geq 3 - 8$ years)	2 tab x 2 / day	1 tab 2x / day	1 tab 2x / day

*Or 1 tab containing 50 mg of artesunate and 135 mg of amodiaquine.

The same dose of drug was re-administered if the patient vomited within 30 minutes after administration. Any patient who persistently vomited after second dosing of drug within 30 minutes was excluded from the study and treated with intravenous quinine or intramuscular artesunate according to national guidelines. Paracetamol has been given to any patient with a body temperature above 38°C . The patients were regularly followed up to D28 and underwent a clinical examination with control of blood smear and axillary temperature measurement on D0, D1, D2, D3, D7, D14, D21 and D28. Capillary blood on filter papers (Wattman 3) was collected systematically from all patients on the day of inclusion D0 and during follow-up after D7 in the event of therapeutic failure.

The protocol that was carried out during this study was validated by the National Malaria Control Program (NMCP).

This study is part of the WHO recommendations to test first and second line drugs used for the management of uncomplicated malaria.

2.4. Microscopic Blood Examination

To confirm compliance with the inclusion and exclusion criteria, each child had a blood sample taken for the Parasite Density (PD) count during screening Day zero (D0) and on days 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28 follow-up. The labeling of the samples was anonymous (screening number, day of follow-up, date). Blood is drawn on a slide for thin and thick smear. Cookies and candies were distributed to the children; soap scoops and travel expenses were given to parents.

The parasite density (PD) is calculated according to the following formula where $\text{PD} (\mu\text{L}) = \text{N} \times 8,000 / \text{X}$

(PD: parasite density; N: number of parasites counted; X: number of leukocytes counted).

Slide is considered negative when examination of 1000 leukocytes or 100 fields containing at least 10 white blood cells per field does not show any asexual form of parasite.

The internal quality control were carried out by a team of physicians and parasitologists respectively from the University Hospital and Faculty of Health Sciences of the Ministry of Higher Education, Research and Innovation (Chad).

2.5. Primary Endpoint

The proportion of patients with early Adequate Clinical and Parasitological Response (ACPR), Treatment Failure designated as Early Treatment Failure (ETF), Late Clinical Failure (LCF), or Late Parasitological Failure (LPF).

2.6. Secondary Endpoint

The frequency and nature of the side effects.

2.7. Data Analysis

The Excel™ spreadsheet developed by WHO was used for data management and analysis. The data were analyzed using the following two methods: Kaplan-Meier method, and

“Per Protocol” analysis ACPR percentages were calculated with a 95% confidence interval.

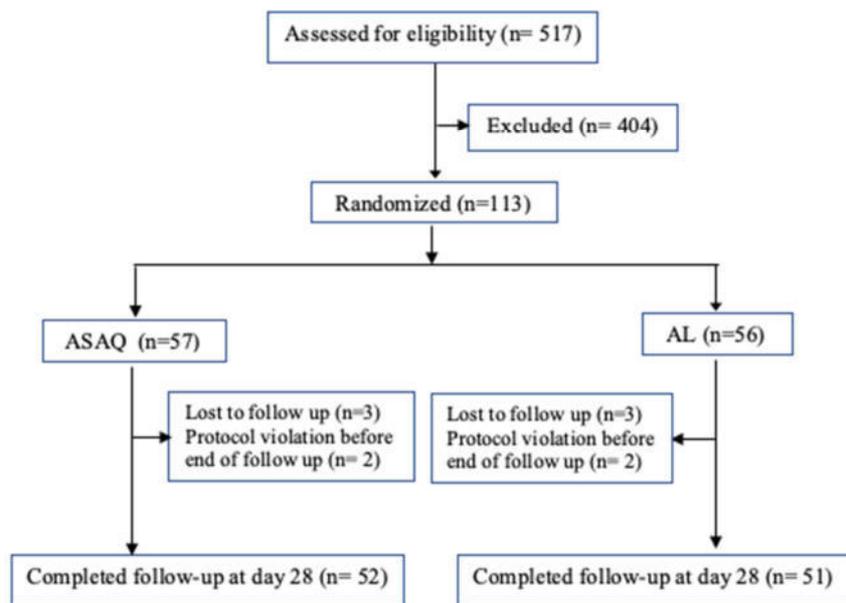
2.8. Ethical Considerations

Before the start of the study, the protocol falling within the framework of the WHO recommendations aimed at testing drugs, in particular ACTs used in 1st and 2nd line, received the approval of the Ministry of Public Health and National Solidarity. Public as well as the authorization of the ethics committee through a research authorization from the Ministry of Higher Education, Research and Innovation of Chad. All parents or legal guardians of the children received a clear explanation of the study and informed consent was obtained.

3. Results

3.1. Population Profile

A total of 113 patients were recruited for uncomplicated malaria during the study period. These patients received ASAQ (n = 57) or AL (n = 56) as treatment after randomization. Among them, 103 out of 113 included were followed up to D28, including 51 in the AL group against 52 in the ASAQ group (shown in Figure 2).



ASAQ: artésunate amodiaquine, AL: artémèther-luméfantrine

Figure 2. Distribution of patients by treatment group and exclusion during follow-up.

3.2. General Characteristic of the Study Population

The children's temperatures varied between 36°C and 40.9°C with an average of 38.6 (1.4) for the AL group and between 36°C and 40.8°C with an average of 38.5 (1.3) for the ASAQ group; Children's weights varied between 7.7 kg and 22.8 kg in the AL group with an average of 14 kg and between 5 kg and 20.4 kg in the ASAQ group with an average of 12 kg.

Of the 56 patients included in the AL group, 32 were male, ie an M/F sex ratio of 1.3; in the ASAQ group, the sex ratio

M/F is 1.2.

The age of the patients varied between 6 months and 59 months. Children aged 48 to 59 months were the most represented respectively with 30.08% in the AL group against 18.58% in the ASAQ group. (Figure 3)

The parasite density (PD) at D0 varied between 2,080 and 35,000 for the AL group against 2,100 and 35,640 for ASAQ. The highest PDs represented 40.35% and 35.71% respectively for ASAQ and AL (figure 4).

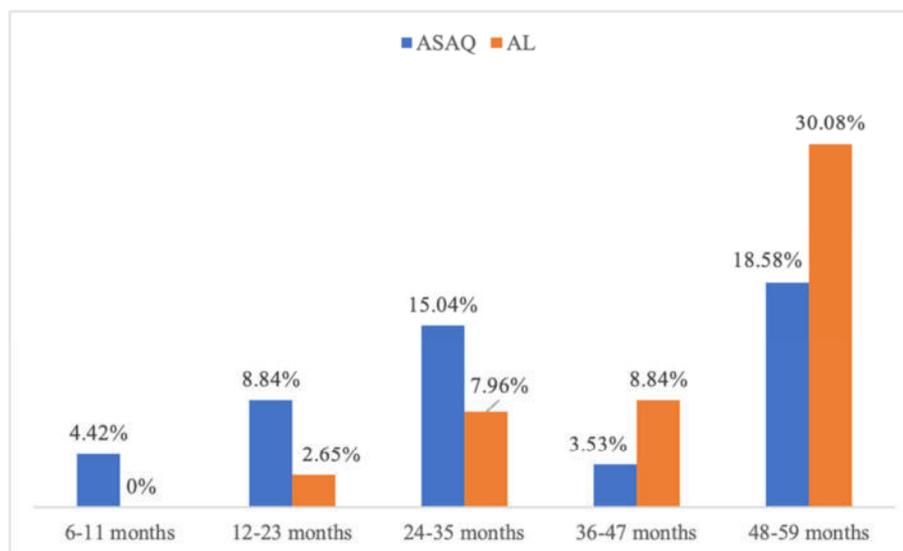


Figure 3. Distribution of patients by age group in the two treatment groups.

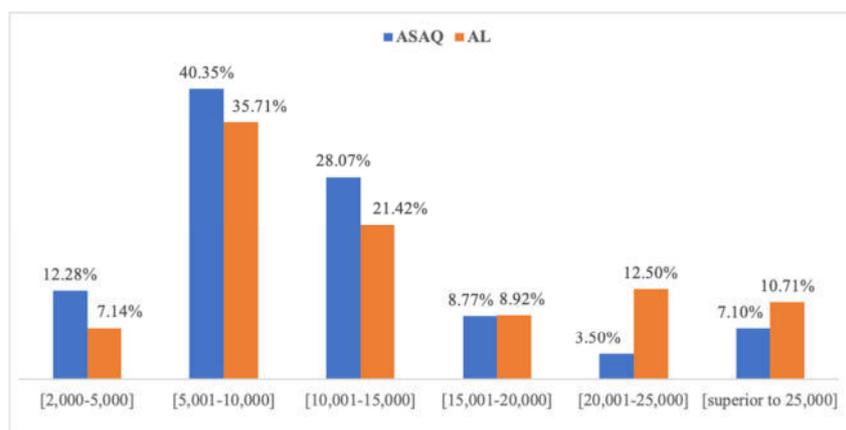


Figure 4. Distribution of patients according to parasite density class and treatment group.

Table 2. Clinical and para-clinical characteristics of the study population.

Characteristics	Molecules	
	AL	ASAQ
Number of patients	56	57
Male (M)	32	32
Female (F)	24	25
Ratio M/F	1.3	1.2
Age (years)		
Average (sd)*	3.6 (1.2)	2.7 (1.4)
Extreme (min-max) in year	1 – 5 years	0.5 – 5 years
Weight (kg), day 0		
Average weight (kg) (sd)	14 (3.3)	12 (3.6)
Extreme (min-max) in kg	7.7-22.8	5-20.4
Temperature (°C), day 0		
Average temperature (sd) °C	38.6 (1.4)	38.5 (1.3)
Extreme (min-max) °C	36-40.9	36-40.8
Parasitaemia (µL), day 0		
Geometric mean parasitaemia (asexual parasites / µL)	11,712	9,534
Extreme (min-max) (asexual parasites / µL)	2,080-35,000	2,100-35,640

*sd: standard deviation, day 0: first day of inclusion and follow-up of patients.

Table 3. Distribution by sex and treatment group.

Drugs	AL (n = 56)	ASAQ (n = 57)	Total (n = 113)
Gender			
Male	32	32	64
Female	24	25	49
M/F sex ratio	1.3	1.2	

3.3. Therapeutic Efficacy of AL and ASAQ at Day 28

Table 4. Responses to treatment on D28 according to the two treatment groups.

Parameters	AL		ASAQ			
	Number	%	IC	Number	%	IC
ETF	0	0.0	0.0-7.0	0	0.0	0.0-6.8
LCF	0	0.0	0.0-7.0	0	0.0	0.0-6.8
LPF	0	0.0	0.0-7.0	0	0.0	0.0-6.8
ACPR	51	100.0	93-100.0	52	100.0	93.2-100.0
Number total	51			52		

ACPR: Adequate Clinical and Parasitological Response; ETF: Early Treatment Failure; LCF: Late Clinical Failure and LPF: Late Parasitological Failure.

At D28 the RCPA was 100% for the two groups AL and

ASAQ, LPF, LCF and ETF were 0% each for the two groups (AL: IC between 0.0-7.0 and ASAQ: IC between 0.0-6.8).

3.4. Tolerance

Table 5. Distribution of patients according to thermal clearance.

Temperature (T°)	AL		ASAQ	
	Average	n	Average	n
D0	38.63	56	38.47	57
D1	37.19	55	37.31	56
D2	36.75	55	36.65	56
D3	36.74	54	36.71	54
D7	37.04	53	36.95	54
D14	36.96	51	37.05	52
D21	37.01	51	37.03	52
D28	36.96	51	37.08	52

Before treatment on D0, the mean temperatures were 38.63°C in the AL group against 38.47°C in the ASAQ group. After treatment on D3, the mean body temperature was 36.74°C in the AL and ASAQ group. At D28 they were 36.91 in AL against 37.08 in ASAQ.

Table 6. Parasite clearance during follow-upst.

Parasite Density (day)	AL		ASAQ	
	Average (ap*/µL)	n	Average (ap*/µL)	n
D0	13711.4	56	11292	57
D1	3063.3	31	1782	23
D2	31.1	13	51.7	6
D3, D7, D14, D21, D28	0	0	0	0

*asexual parasites.

On D0 the mean parasite densities in the two groups were 13711.4 in the AL group against 11292 in the ASAQ group; the densities were zero from D3 to D28.

Table 7. Proportion of the most frequent adverse events.

Adverse events	AL (n=56)		ASAQ (n=57)		n (%)
	n	%	n	%	
Abdominal pain	3	5.3	4	7	7 (06.7%)
Asthenia	8	14.2	7	12.2	15 (13.5%)
Vomiting	3	5.3	0	0	3 (02.9%)
Diarrhoeas	4	7.1	3	5.2	7 (06.7%)
Anorexia	7	12.5	8	14	15 (13.5%)
cough	3	5.3	2	3.5	5 (04.8%)
Total	28	50	24	42.1	52 (50.4%)

The most common adverse events were asthenia and anorexia with a similar percentage of 13.5% in the two groups (AL and ASAQ) followed by 6.7% abdominal pain and diarrhoeas in both groups. Vomiting was only seen in the AL group.

4. Discussions

This study aimed at evaluating the therapeutic efficacy and safety of Artemether-Lumefantrine (AL) and Artesunate-Amodiaquine (ASAQ) combinations in the management of uncomplicated *P. falciparum* malaria at the level of health centers from Massakory (Figure 1). These two therapeutic

combinations based on artemisinin are included in the list of drugs of the national policy for the management of malaria in Chad since 2005. They are also subsidized by the government and its development partners. To meet the WHO recommendations on regular efficacy tests in order to guarantee an effective and tolerated treatment of these combinations and above all that their evaluations must be as regular and continuous in order to avoid the emergence of resistance to *P. falciparum* to these antimalarial drugs. For this reason, it is important to have data on the efficacy of ACTs in Chad on the one hand and on the other hand to assess the level of resistance to these two molecules.

Our study site was chosen on the basis that Massakory is a malaria endemic area. Malaria transmission is continuous and hardly ever stops throughout the year during the dry season. Massakory are home to many ponds that are veritable breeding grounds, thus exposing the population to infesting bites from mosquitoes, the main vectors of malaria transmission. During the rainy season, the formation of water pockets following rainfall and the retention of water in the vicinity of dwellings also contribute to this mode of transmission.

We recorded a total of 113 patients during our study, of which 64 (56.6%) were male and 49 (43.4%) female for a sex ratio of 1.3. The sex ratio was 1.3 in the AL group and 1.2 in the ASAQ group. This male predominance was also found by Hamadou B et al [8]. Our study, on the other hand, differs from that of Souleymane Issa M et al who found a rate of 44.8% with a sex ratio of 0.81 [9]. These results cannot be statistically significant because malaria affects both sexes.

All the children included in the study were aged 6 to 59 months. The vast majority were in the age group [48-59 months], ie 31% for the AL group and 18.5% for the ASAQ group. However, the results of our study showed that all age groups ranging from 6 months to 59 months are affected by malaria. No age group is spared, which leads us to believe that children under five are vulnerable to malaria.

The two study molecules (AL and ASAQ) are homogeneous and comparable. This study shows that they are effective for the treatment of uncomplicated malaria with the adequate clinical and parasitological responses (ACPR) which was 100% in both groups. The evaluation of the effectiveness of ACTs in the neighboring countries of Chad also showed good effectiveness of ASAQ and AL. Particularly in Democratic Republic of Congo De Wit M. et al, found similar results (95% ASAQ and 99% AL) [10]. Issa I et al in Niger found results showing adequate clinical and parasitological responses with respectively 93.1% and 94.1% for AL and ASAQ [11]. In the rest of Africa Sow D et al, and in Asia Ashley EA et al, Takala H et al. attesting to the constant efficacy of the AL and ASAQ combinations with efficacy rates always above 95% [12, 4, 7]. In Mali, the work of Ibrahim M. L. et al, showed that the adequate clinical and parasitological response is respectively 94.8% for AL and 97.1% for ASAQ [13]. Unlike Tinto H. et al. and Sondo P. et al in Burkina Faso showed a low cure rate on D28 [14, 15]. These results could indicate a decrease in sensitivity of *P.*

falciparum to these two molecules.

On D0, the mean temperature of the patients was 38.6 °C in the AL group and 38.5 in the ASAQ group (before treatment). At the end of treatment on D2, the mean temperature rose to 36.7 in AL and to 36.6 in the ASAQ group (Table 4). This significant drop in mean body temperature made it possible to determine the thermal clearance, which is 48 hours. This shows the effectiveness of the two CTAs used in our study. A decrease in the proportion of febrile patients was noted in both arms after the first day of treatment. Only 7.6% of patients in the ASAQ arm and 9.2% in the AL arm were febrile on the second day of treatment, but the difference was not significant ($p = 0.62$) [11].

The mean parasitaemia in the two treatment groups was similar on D0. Parasite clearance was in both molecules less than 72 hours and the two groups were comparable in the elimination of asexual forms of *Plasmodium falciparum* from the blood. The reduction in parasitaemia, which was satisfactory from the start of treatment in both groups, shows us that these artemisin-based combinations would effectively help reduce the parasite burden responsible in part for the progression from uncomplicated malaria to the severe form. The results of Issa I *et al* in Niger showed rapid parasite clearance in both groups 48 h after the first dose [11]. Only 7 (8.9%) patients in the AL arm and 4 (5.3%) in the ASAQ arm had residual parasitaemia on the second day without significant difference ($p = 0.55$). The differences observed may have had effects on the comparison of efficacy, especially since it is reported in the literature that factors such as age, level of parasitaemia on admission or immune status may, in some cases, influence parasite clearance [7, 16, 17].

Adverse events were relatively more frequent in the ASAQ group compared to the AL group and consist mainly of abdominal pain and vomiting. Monitoring of anorexia, asthenia and headache. However, serious adverse events were not encountered (Table 7). These minimal adverse events are reported in most studies involving amodiaquine and are believed to be largely due to the drug's mechanism of action and its bitter taste. In Chad Tchoufiene (2013) observed the same signs dominated by vomiting (54.5%) in the ASAQ group [18], Souleymane Issa M observed in Pala (2017) all adverse events mild a predominance of loss of appetite (10.3%) followed by cough (7%) abdominal pain and vomiting (3.5%) [9]. No severe adverse events have also been reported as Touré *et al* in 2012 did not record any severe adverse effects but some signs described above in the occurrence of asthenia, abdominal pain and vomiting are respectively in 14%, 7% and 6% of cases [19]. Issa I *et al* (2020) to Mali found that the number of patients on AL and ASAQ treatment who developed an adverse reaction are 7.6% and 28%, respectively [11]. However, these various minor side effects observed are similar to those usually described in the tolerance assessment of ACTs, Nji A. M. *et al* (2015) to Cameroon, In this study, the most commonly observed side effects are vomiting, abdominal pain, dizziness and diarrhea [17]. These adverse effects correspond to those most frequently encountered during treatment with ACT by

Bassi P *et al* to Nigéria (2016), Grandesso F *et al*, Ibrahim ML *et al* in Niger (respectively 2018 and 2016) [20, 21]. Overall the two therapeutic regimens were well tolerated, the side effects being so minor, it is also important to mention them [23-26].

5. Conclusion

The two combinations form of ACT remain effective in the treatment of uncomplicated *P. falciparum* malaria in Chad. The RCPA was 100% for both molecules. Fever and parasite clearance times were 48 hours and 72 hours respectively. Tolerance to AL and ASAQ were generally good. However, regular monitoring of the effectiveness of these combinations is desirable to prevent treatment failures according to WHO recommendations in the fight against uncomplicated *P. falciparum* malaria in children from 6 months to 59 months. It is desirable that this work can be repeated in the various health centers in Chad in order to monitor the therapeutic efficacy of the antimalarial drugs used. Further studies are warranted in different regions of Chad for monitoring of drug resistance.

Acknowledgements

We would like to thank the Ministry of Public Health and National Solidarity, the National Malaria Control Program and all the nursing staff of the Massakory Health Center.

References

- [1] World Health Organization (WHO). (2017). World malaria report 2017. Geneva (http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/259492/1/9789241565523-eng.pdf, accessed 19 December 2019) ISBN 978-92-4-156552-3.
- [2] World Health Organization. (2009). Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. World Health Organization. https://apps.who.int/iris/handle/10665/44048 accessed 19 December 2019.
- [3] Noedl, H., Se, Y., Schaefer, K., Smith, B. L., Socheat, D., & Fukuda, M. M. (2008). *Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Western Cambodia. New England Journal of Medicine*, 359 (24), 2619–2620.
- [4] Ashley, E. A., Dhorda, M., Fairhurst, R. M., Amaratunga, C., Lim, P., Suon, S., Sreng, S., Anderson, J. M., Mao, S., Sam, B., Sopha, C., Chuor, C. M., Nguon, C., Sovannaroth, S., Pukrittayakamee, S., Jittamala, P., Chotivanich, K., Chutasmit, K., Suchatsoonthorn, C., Runchaoen, R.,... Tracking Resistance to Artemisinin Collaboration (TRAC) (2014). Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *The New England journal of medicine*, 371 (5), 411–423.
- [5] Menard, D., & Dondorp, A. (2017). Antimalarial Drug Resistance: A Threat to Malaria Elimination. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 7 (7), a025619.

- [6] Ménard, S., Ben Haddou, T., Ramadani, A. P., Arieu, F., Iriart, X., Beghain, J., Bouchier, C., Witkowski, B., Berry, A., Mercereau-Puijalon, O., & Benoit-Vical, F. (2015). Induction of Multidrug Tolerance in *Plasmodium falciparum* by Extended Artemisinin Pressure. *Emerging infectious diseases*, 21 (10), 1733–1741.
- [7] Takala-Harrison, S., & Laufer, M. K. (2015). Antimalarial drug resistance in Africa: key lessons for the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1342, 62–67.
- [8] Hamadou Bouare. (2018). Test d'efficacité Thérapeutique de la combinaison Arthemeter-Lumefantrine (AL) et Artesunate-Amodiaquine (ASAQ) dans le traitement du paludisme simple a *P. falciparum* à Sélingué et à Missira en 2016. These Med: Université da Bamako (Mali), 120 p.
- [9] Souleymane ISSA M, Clément KH, Denis MM, et al. (2017) Therapeutic Efficacy of Artesunate-Amodiaquine and Polymorphism of *Plasmodium falciparum* k13-Propeller Gene in Pala (Tchad). *Int J Open Access Clin Trials* 1 (1): 1.
- [10] Mari De Wit, Anna Louise Funk, Krystel Moussally, David Aksanti Nkuba, Rubbis Siddiqui, Karla Bil, Erwan Piriou, Aldert Bart, Patrick Bahizi Bizoza and Teun Bousema. (2016). In vivo efficacy of artesunate-amodiaquine and artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated *falciparum malaria*: an open-randomized, non-inferiority clinical trial in South Kivu, Democratic Republic of Congo. *Malaria Journal*, 15 (1).
- [11] Issa Ibrahima, Ibrahim Maman Laminou, Eric Akehossi, Daou Maman, Saidou Boureima, Hama Kadri Harouna, Hamadou, Hassan Hamidou, Aboubacar Mahamadou, Idrissa Yacouba, Jackou Hadiza, Ilagouma Amadou Tidjani (2020) Study of therapeutic and therapeutic efficacy tolerance of artemether-lumefantrine and artesunate-amodiaquine in Niger. *Bull Soc Pathol Exot* doi 10.3166 / bspe-2020.
- [12] Sow D, Ndiaye JL, Sylla K, et al (2016) Evaluation of the efficacy and safety of artesunate-amodiaquine, dihydroartemisinin-piperaquine and artemether-lumefantrine combinations for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Senegal. *Med Santé Trop* 26 (1): 45-50.
- [13] Ibrahim ML, Sadou F, Daou M, et al (2016) Comparison of therapeutic efficacy and tolerance of artemether-lumefantrine and artesunate-amodiaquine combinations in Niger. *Mali Med* 31 (1): 1-7.
- [14] Tinto, Halidou, Diallo Salou, Issaka Zongo, Issa Guiraud, Innocent Valea, Adama Kazienga, Hervé Kpoda, Herman Sorgho, Jean-Bosco Ouédraogo, Tinga Robert Guiguemdé and Umerto D'Alessandro. (2014). Effectiveness of artesunate-amodiaquine vs. artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated *falciparum malaria* in Nanoro, Burkina Faso: a non-inferiority randomised trial. *Tropical Medicine & International Health*, 19 (4), 469–475.
- [15] Sondo, P., Derra, K., Diallo-Nakanabo, S., Tarnagda, Z., Zampa, O., Kazienga, A., Valea, I., Sorgho, H., Owusu-Dabo, E., Ouédraogo, J. B., Guiguemde, T. R., & 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.
- [16] Houh, Y. K., Kim, K. E., Park, S., Hur, D. Y., Kim, S., Kim, D., Bang, S. I., Yang, Y., Park, H. J., & Cho, D. (2017). The Effects of Artemisinin on the Cytolytic Activity of Natural Killer (NK) Cells. *International journal of molecular sciences*, 18 (7), 1600.
- [17] Nji, A. M., Ali, I. M., Moyeh, M. N., Ngongang, E.-O., Ekollo, A. M., Chedjou, J.-P.,... Mbacham, W. F. (2015). Randomized non-inferiority and safety trial of dihydroartemisinin-piperaquine and artesunate-amodiaquine versus artemether-lumefantrine in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Cameroonian children. *Malaria Journal*, 14 (1), 27.
- [18] Tchoufiene 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.
- [19] Toure, O. A., Assi, S. B., N'Guessan, T. L., Adji, G. E., Ako, A. B., Brou, M. J., Ehouman, M. F., Gnamien, L. A., Coulibaly, M. A., Coulibaly, B., Beourou, S., Bassinka, I., Soumahoro, A., Kadjo, F., & Tano, M. A. (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.
- [20] Bassi P, Osakwe AI, Suku C, et al (2016) Cohort event monitoring of patients treated for uncomplicated malaria with artemisinin-based combination therapies in selected hospitals and community pharmacies in Nigeria. *Niger Postgrad Med J* 23 (4): 172-181.
- [21] Grandesso F, Guindo O, Woi Messe L, et al (2018) Efficacy of artesunate-amodiaquine, dihydroartemisinin- piperaquine and artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Maradi, Niger. *Malar J* 17 (1): 52.
- [22] Odhiambo G, Bergmann-Leitner E, Maraka M, Wanjala CNL, Duncan E, Waitumbi J, et al (2019) Correlation Between Malaria-Specific Antibody Profiles and Responses to Artemisinin Combination Therapy for Treatment of Uncomplicated Malaria in Western Kenya. *J Infect Dis*; 219 (12): 1969-79.
- [23] Faye, B., Kuété, T., Kiki-Barro, C. P., Tine, R. C., Nkoa, T., Ndiaye, J. L., Kakpo, C. A., Sylla, K., El Menan, H., Gaye, O., Faye, O., Same-Ekobo, A., & Moussa, K. (2012). Multicentre study evaluating the non-inferiority of the new paediatric formulation of artesunate/amodiaquine versus artemether/lumefantrine for the management of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in children in Cameroon, Ivory Coast and Senegal. *Malaria journal*, 11, 433.
- [24] Schramm, B., Valeh, P., Baudin, E., Mazinda, C. S., Smith, R., Pinoges, L., Dhorda, M., Boum, Y., 2nd, Sundaygar, T., Zolia, Y. M., Jones, J. J., Comte, E., Houzé, P., Jullien, V., Carn, G., Kiechel, J. R., Ashley, E. A., & Guérin, P. J. (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.
- [25] Lingani, M., Bonkian, L. N., Yerbanga, I., Kazienga, A., Valéa, I., Sorgho, H., Ouédraogo, J. B., Mens, P. F., Schallig, H., Ravinetto, R., d'Alessandro, U., & Tinto, H. (2020). In vivo/ex vivo efficacy of artemether-lumefantrine and artesunate-amodiaquine as first-line treatment for uncomplicated *falciparum malaria* in children: an open label randomized controlled trial in Burkina Faso. *Malaria journal*, 19 (1), 8.



Genetic Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Gene, *pfcr* in Massakory (Chad)

Mahamat Moussa Hassane Taïssou^{1, 2, *}, Ako Aristide Berenger², Issa Mahamat Souleymane³, Kouï Stéphane Tossea², Kouman Kouamé Bouatini Angelo², Hamit Mahamat Alio¹, Mahamat Saleh Issakha Diar³, Djiddi Ali Sougoudi⁴, Djimadoum Mbanga¹, Pascal Ringwald⁵, Djimrassengarh Honoré⁶, Issa Ali Hagggar⁴, Hassoumi Manah⁴, Hassan Ahmat Mihedi³, N'garadoum Olivier³, Brahim Boy Otchom¹, David Koffi², Dosso Mireille², Djaman Allico Joseph⁷, Offianan André Touré²

¹Faculty of Science and Human Health, University of N'Djamena, N'Djamena, Chad

²Department of Parasitology Mycology, Institute Pasteur, Abidjan, Côte d'Ivoire

³Chad National Malaria Control Program, N'Djamena, Chad

⁴Ministry of Health, Public and Human Solidarity, N'Djamena, Chad

⁵World Health Organization, Geneva, Switzerland

⁶World Health Organization, N'Djamena, Chad

⁷Clinical and Fundamental Biochemistry Department Institute, Pasteur, Cote d'Ivoire

Email address:

taissomahamat@gmail.com (M. M. H. Taïssou), taissomahamat@icloud.com (M. M. H. Taïssou),

Issa.mahamatsoul@gmail.com (I. M. Souleymane), Andre_offianan@yahoo.fr (O. A. Touré)

*Corresponding author

To cite this article:

Mahamat Moussa Hassane Taïssou, Ako Aristide Berenger, Issa Mahamat Souleymane, Kouï Stéphane Tossea, Kouman Kouamé Bouatini Angelo, Hamit Mahamat Alio, Mahamat Saleh Issakha Diar, Djiddi Ali Sougoudi, Djimadoum Mbanga, Pascal Ringwald, Djimrassengarh Honoré, Issa Ali Hagggar, Hassoumi Manah, Hassan Ahmat Mihedi, N'garadoum Olivier, Brahim Boy Otchom, David Koffi, Dosso Mireille, Djaman Allico Joseph, Offianan André Touré. Genetic Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Gene, *pfcr* in Massakory (Chad). *American Journal of BioScience*. Vol. 10, No. 1, 2022, pp. 24-30. doi: 10.11648/j.ajbio.20221001.14

Received: December 8, 2021; Accepted: December 22, 2021; Published: January 15, 2022

Abstract: *Background and Objective:* In 2005, Chad, like several other WHO countries, withdrew chloroquine as a first-line treatment for *Plasmodium falciparum* malaria in response to WHO recommendations related to the reason for the increase in treatment failures and the global spread of chloroquine resistance. Artemisinin-based combination therapy (ACTs), Artemether-lumefantrine, has replaced chloroquine as the first-choice treatment for malaria. The present study assessed *pfcr* polymorphism in *Plasmodium falciparum* isolates in Massakory. *Methodology and Results:* Blood samples for PCR analysis were collected on Whatman 3MM filter paper in Massakory during a therapeutic efficacy study (TES) conducted from December 14, 2019 to March 14, 2020. Genomic DNA was extracted from 113 dried blood spots with the QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA) as per manufacturer's protocol and amplified by nested-PCR with *pfcr* specific primer. The amplification products were revealed by electrophoresis on 2% agarose gel and then sequenced according to Sanger method. A total of 71 sequences were readable. The *pfcr* analysis showed that of the 71 readable sequences, high mutation prevalence: 66 (92.96%) IET, 2 (4.22%) IDT and 3 (4.22%) MNK wild *pfcr* isolates. *Conclusion:* These results challenge the highest health authorities in the country. The government, through the Ministry of Public Health and National Solidarity and the National Malaria Control Program, must raise awareness for the effective withdrawal of chloroquine. This action will promote on the one hand the re-emergence of parasites sensitive to chloroquine, and on the other hand make possible the reintroduction of chloroquine in the treatment of simple malaria after the suppression of drug pressure.

Keywords: Malaria, *pfcr*, Chloroquine, *Plasmodium falciparum*, Massakory, Chad

1. Introduction

Malaria is still a serious public health problem today, despite the achievements made over the past decade in the fight against this parasitosis. According to the latest world health organization (WHO) report, in 2019, there were an estimated 229 million cases of malaria worldwide with an estimated 409,000 deaths [1]. To combat malaria, WHO currently recommends a range of interventions including the use of Insecticide-Treated Nets (ITNs), Intermittent Preventive Treatment (IPT) in pregnant women, and timely and effective case management with Artemisinin-based Combination Therapies (ACT) for simple oral malaria and artesunate, artemether and quinine parenterally for severe malaria.

The progress made in recent years has been possible thanks to the combination of two major strategies, including rapid and efficient case management by ACT and prevention through the massive use of Long-Acting Impregnated Mosquito Nets (LLINs). Indeed, since the emergence and spread of resistance of *P. falciparum* to common antimalarials including chloroquine and Sulfadoxine-pyrimethamine, ACT has been recommended in the therapeutic management of simple malaria in almost all malaria-endemic areas under the impetus of the WHO.

In 2005, Chad, like several other WHO countries, withdrew chloroquine as a first-line treatment for *Plasmodium falciparum* malaria in response to WHO recommendations related to the reason for the increase in treatment failures and the global spread of chloroquine resistance. The National Malaria Control Program (NMCP) guidelines recommend Artesunate-Amodiaquine (ASAQ) as the first line for treatment of simple malaria and as a second line in case of treatment failure, contraindication or intolerance to ASAQ, Artemether-Lumefantrine (AL). In pregnant women in the first trimester, management is done with quinine in oral form, ACT being recommended only from the second trimester of pregnancy. The therapeutic management of malaria cases is now hampered by the resistance of *P. falciparum* to artemisinin derivatives and their partner molecules including amodiaquine, lumefantrine, piperaquine (DHA-PPQ) etc.

Indeed, clinical resistance to artemisinin, manifested by delayed parasite clearance, was first reported in Pailin, western Cambodia in 2009 [2]. This resistance has spread to all countries in the Greater Mekong subregion [3, 4]. The presence of resistance to ACT partner drugs caused treatment failure with DHA-PPQ, AL, etc. [5, 6].

Monitoring the effectiveness of antimalarial drugs is an essential part of the fight against malaria. Indeed, resistance to antimalarials can have devastating consequences including an increase in morbidity and mortality. Resistance to artemisinin derivatives in Southeast Asia in recent years is seriously undermining the control gains of ACT. In Chad, recent studies have shown the effectiveness of ASAQ [7] and absence of resistant mutations in the *k13 propeller* gene, an artemisinin resistance gene [8].

Chloroquine is the first synthetic antimalarial. From 1944, this active ingredient will be used in prophylaxis and for the treatment of un complicated malaria attacks. Inexpensive, it will quickly become the most used antimalarial during the twentieth century. Once in the digestive vacuole, chloroquine inhibits the detoxification of heme into hemozoin. Given fairly high levels of resistance observed in malaria-endemic areas, this molecule is no longer recommended in the management of cases of simple malaria a *P. falciparum* even in combination with artemisinin derivatives. However, chloroquine continues to be used for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in areas where resistance to chloroquine is zero or low [9] as well as to treat *Plasmodium vivax* malaria [10].

Indeed, most of the chloroquine-resistant strains of *P. falciparum* studied showed a deficiency in the concentration of the drug in the digestive vacuole, more likely in connection with a rapid efflux of chloroquine-resistance out of the vacuole, than with a decrease in the penetration of the product [11].

The study of the genome of resistant parasites has allowed the identification of a gene linked to resistance to chloroquine: *pfprt* (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter).

Numerous research studies have demonstrated the importance of the K76T mutation in the *pfprt* gene in chloroquine resistance [12]. Epidemiological studies revealed the presence of several additional mutations (about 8 mutations) to K76T in the *pfprt* gene, defining several mutant haplotypes. It has also been shown that the expression of some of these haplotypes modifies the level of sensitivity to other lysosomotropism used alone or in combination, in the treatment of simple or severe malaria attacks, such as quinine, mefloquine, halofantrine, amodiaquine or artemisinin [13, 14]. Thus, in accordance with their ability to modify the physiology of the digestive vacuole, *pfprt* alleles modulate sensitivity to first-line ACTs [15]. A meta-analysis of the therapeutic efficacy of the two widely used CTAs, artesunate-amodiaquine (ASAQ) and artemether-lumefantrine (AL), revealed a reduction in reinfection time for parasites encoding the mutant *Pfprt* [16].

The polymorphism of the *pfprt* gene has been little studied in Chad while drug pressure seems to be strong probably related to the use of chloroquine in self-medication.

2. Materials and Methods

2.1. Site and Study Period

The study was conducted in the Massakory I Health Center, Hadjer Lamis Provincial Health District (DSP). The Massakory I Health Center is located about 160 km away at the northern exit of N'Djamena. Map link Latitude: 13.0016804 Longitude: 15.7286011. The study was conducted from December 14, 2019 to March 14, 2020 at the

Massakory I Health Center.

The blood collected in Massakory on Whatman filter paper was sent to Malariology Unit of Institut Pasteur of Côte

d'Ivoire for PCR analysis. The study involved patients aged 6 to 59 months, who came to the Massakory health center for fever and other signs presumptive of malaria.

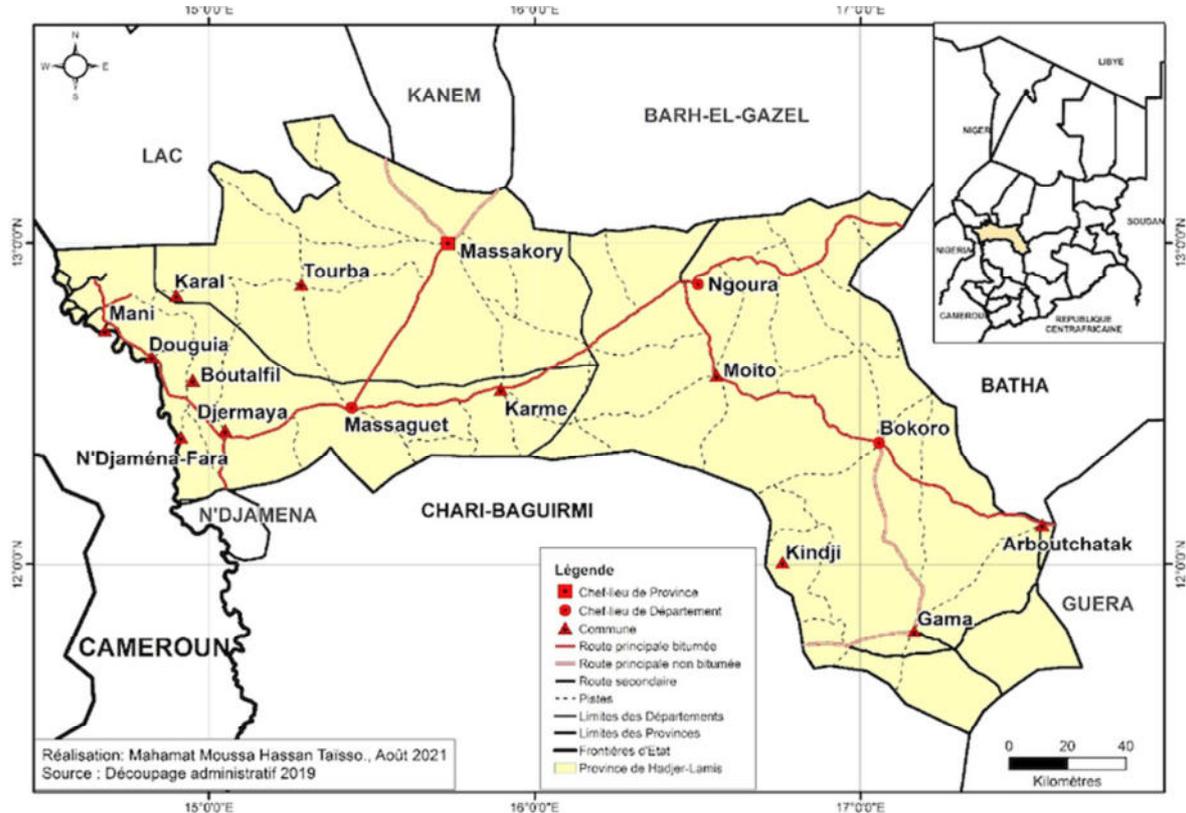


Figure 1. Location of the study site (Administrative division 2019).

2.2. Collection of Blood Samples

Blood samples for PCR analysis were collected on Whatman 3MM filter paper. A total of 3 drops of blood were spotted on filter paper. Dried at room temperature (25°C) and wrapped in desiccant-containing plastic bags, the filter paper was stored dry for genomic DNA extraction. The dried blood spot were then sent to Malariology Unit of Institute Pasteur of Cote d'Ivoire for DNA extraction and amplification.

2.3. DNA Extraction

DNA extraction and amplifications: Genomic DNA was extracted from dried blood spots with the QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA) as per manufacturer's protocol. Briefly, filter paper was cut, and then denatured with Proteinase K. The lysate was washed twice with buffers through a silicate-containing membrane. Lastly, DNA was eluted with ultra-pure water.

2.4. Amplification of the *pfprt* Gene

For plasmodial species typing, the targeted gene was that of the 18S subunit of the ribosomal RNA of *Plasmodium falciparum*, by the protocol of Snounou et al in 1993.

For the detection of point mutations on the *pfprt* gene, conventional gene amplification was performed. The reactive

medium was composed of MasterMix enzyme 5X FIREPol MasterMix RTL with 12.5 mM MgCl₂ from the company Solis Biodyne (enzyme, MgCl₂, DNTPs, buffer), molecular biology quality water and primers *SecIF* GGTAAATGTGCTCATGTGTTAAACTTATT, *SecIR* TTACTTGAATTTCCCTTTTATTCCATTCCA.

The amplification program began with a denaturation of the DNA strands at 95°C for 10 minutes followed by 31 cycles distributed as follows: a cyclic denaturation of 15 seconds at 95°C, hybridization at 60°C for 2 minutes and a cyclic elongation of one minute at 72°C. After the cycles, a final elongation of 7 minutes at 72°C was performed. The amplicons obtained were revealed by electrophoresis on 2% agarose gel. The images were viewed using *gelDoc* software. The size of interest of the amplicon was 241 bp.

The *Qiagen QIAquick Gel Extraction* kit was used to carry out the purification of the products obtained after conventional gene amplification. According to the manufacturer's protocol; After purification, 1 microliter of the purified product was used to read the optical density to check the nucleic acid concentration. The purified amplicons were automatically sequenced by the Sanger method at the Sanger CRCHU Sequencing Platform in Quebec City, Canada. The samples packaged according to the recommendations of the platform were sent via an international delivery company.

2.5. Analysis of Sequencing Data and Identification of Mutations

The raw sequencing data was cleaned using MEGA 11 software. All sequences were then aligned using BioEdit 7.2.5 software using as the reference sequence of the *pfprt* gene the PF3D7_0709000.1 sequence available on PlasmoDB (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.6. Ethical Considerations

Before the start of the study, the protocol received the approval of the Ministry of Public Health as well as the authorization of the ethics committee through a research authorization from the Ministry of Higher Education, of Research and Innovation of Chad. All parents/guardians of the children were given a clear explanation of the study and informed consent was obtained prior to any study procedure being performed.

3. Results

A total of 113 febrile children aged 6 to 59 months had been recruited into the Massakoy study. The age of the patients ranged from 6 months to 59 months. The parasites density on D0 ranged from 2100 to 35000 globally, and 2080 to 35000 (ET 7921.20) for the AL group compared to 2100 and 29080 (ET 8471.26) for ASAQ. Clinical and parasitological results had been published elsewhere [17].

Molecular Characterization of the *Pfprt* Gene

A total of 113 samples were used for DNA extraction by Qiagen Kit following the manufacturer's recommendations. DNA concentrations ranged from 1.58 to 22.65 ng/μL with an average of 8.58 ng/μL. Molecular diagnosis of the species by real-time PCR confirmed that all isolates were of the species *Plasmodium falciparum*. For the *pfprt* gene 113 samples or 100% were amplified (Figure 3). However, only 80 samples were sent for sequencing. These samples were chosen randomly.

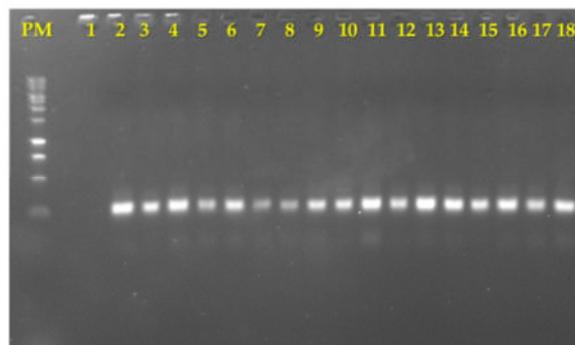


Figure 2. Electrophoretic profile of the *pfprt* gene.

PM =Molecular weight marker (1kb)
 1 = negative control
 2= Positive control
 3-18= Amplified samples with *pfprt* primers (SecIF/SecIR)
 Amplicon size = 241 bp.

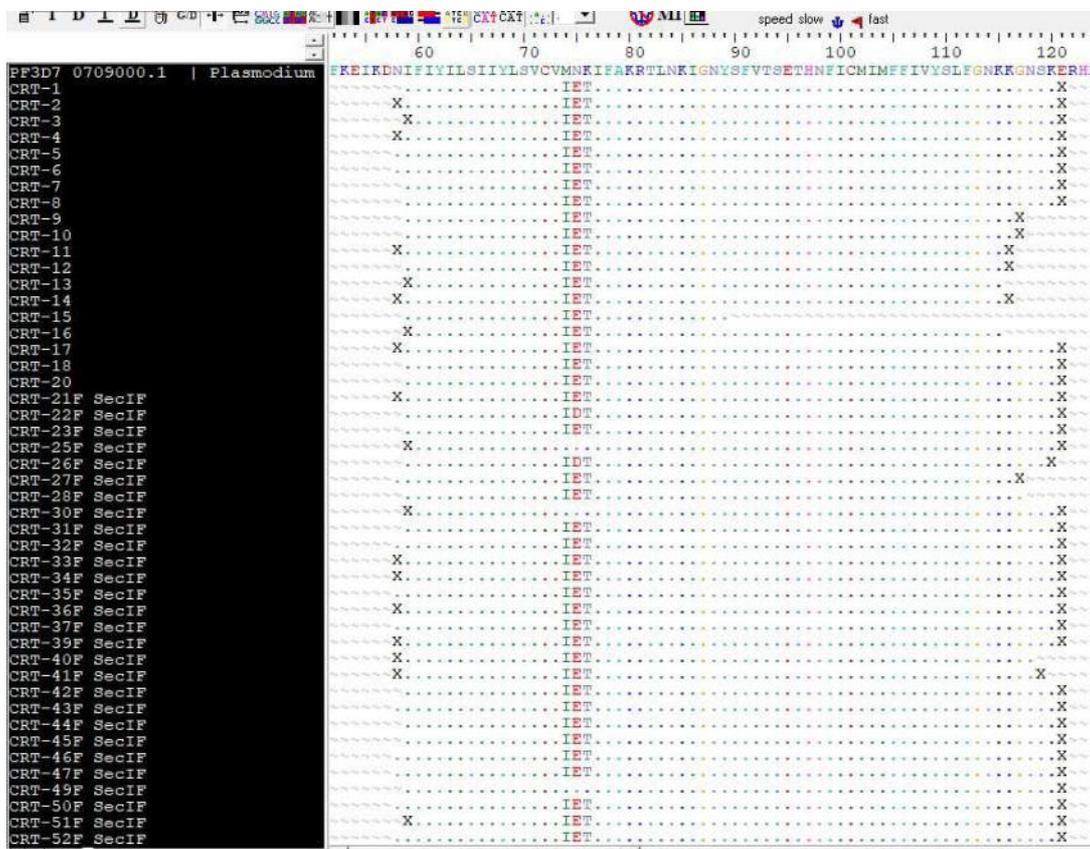


Figure 3. Alignment of the sequences of the *pfprt* gene (1).



Figure 4. Alignment of *pfert* gene sequences (2).

The *pfert* analysis showed 71 readable sequences (Figures 4 a, b). The table 1 indicate the distribution of pure mutations. Of the 71 readable sequences, 68 contained the three *pfert* IET/IDT mutation points. The results showed 3/71 wild *pfert* isolates M-74/N-75/K-76, 68 pure mutants with 66 triple mutant isolates M74I/N75E/K76T and 2 triple mutant isolates M74I/N75D/K76T (Table 2).

Table 1. Distribution of pure mutations in the *pfert* gene for n=71.

Position	Allele	Effective (%)
74	I	68 (95.77)
75	E	66 (92.96%)
	D	2 (2.82%)
76	T	68 (95.77)

Table 2. Prevalence of *pfert* genotypes.

Gene	Genotype	Effective (n=71)	%
Pfcrt	MNK	03	4.22
	IET	66	92.96
	IDT	2	2.82
	Total	71	100

4. Discussion

Resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs has hampered efforts to eradicate malaria. The higher proportion of clinical isolates carrying the mutant allele Thr-76 of the *pfert* gene had led several countries including Chad to withdraw chloroquine in 2005. The informal use of chloroquine has been observed in most parts of Chad, including the town of Massakory. Nowadays no study on the polymorphism of the *pfert* gene has been carried out in this city in Chad.

Analysis of the 71 readable sequences on the 80 sequenced samples, indicated a frequency of 92.96% of IET genotypes.

According to the report of the Ministry of Public Health and INSEED on malaria indicators in Chad in 2017, Chad has three bioclimatic zones that determine three epidemiological profiles or facies of malaria (north, center and south). The city of Massakory located between the desert north, where 2.6% of the country's total population lives, is made up of oases and concentrates the majority of imported malaria cases and the center, whose climate is of the Sahelian type corresponds to

unstable malaria, due to short seasonal transmission.

Despite the government's declaration on the official withdrawal of chloroquine, Massakory is one of the cities that informally use this molecule hence the maintenance of drug pressure. The use of chloroquine for the treatment of malaria would have led to a high prevalence of these mutant strains in this city because if its withdrawal had been respected it could be accompanied by a drastic decrease or decrease in these mutant strains as reported by Paul Sondo *et al.* in 2021 in Burkina Faso [18]. Indeed, when the drug pressure decreases, the proportion of sensitive parasites increases and that of resistant parasites decreases [19]. This is not the case found during this study in Chad.

The government through Chad's Ministry of Public Health and National Solidarity must increase awareness or lobbying for an effective withdrawal of chloroquine. Such a decision was taken in Malawi where a reintroduction of chloroquine for the prevention and treatment of malaria is demonstrated possible. Indeed, Malawi was the first African country to stop using chloroquine due to widespread resistance, less than a decade after the removal of drug pressure, the chloroquine-resistant molecular marker of malaria had disappeared and the drug was found to have excellent clinical efficacy [20].

Recent studies in malaria-endemic countries had reported the re-emergence of chloroquine-sensitive parasites in areas where there has been sustained withdrawal of chloroquine, which has mainly resulted from the re-expansion of the wild type after the removal of drug pressure. This is the work of Mwanza *et al.*, 2016 in Zambia who reported a 100% prevalence of chloroquine-sensitive strains (CVMNK) [21], Mekonnen *et al.*, 2016 in Ethiopia with a frequency of susceptible strains of 95.9% [22]. William *et al.*, 2015 in Kenya had also reported a decline in the prevalence of K76T to 41% after the 3 years of discontinuation of official chloroquine use [23].

In Nigeria Ikegbunam *et al.* in 2019, reported 94.54% CVIET haplotype after analysis of 55 samples of *Plasmodium falciparum* [24]. This high prevalence was explained by the continued use of Chloroquine in Nigeria despite its withdrawal decided by the government. Massakory a crossroads where the supply of general merchandise and pharmaceutical products including chloroquine is from Nigeria. This could explain the possibility of chloroquine supply to the population of

Massakory. Oladipo *et al.* in 2015 also reported in their work that 91.6% (109/119) of children with *P. falciparum* infection harbored parasites with the mutant *pfcr* haplotype CVIET compared to 4.2% of wild type (CVMNK) [25]. Similar results were reported by Djaman *et al.* [26]. Recent work by Dagnogo *et al.* in Côte d'Ivoire reported a predominance of MNK genotype (wild type) with a frequency of 62% [27]. In contrast, single mutant, double mutant and triple mutant genotypes were observed with prevalence of 12%, 6% and 18% respectively. The low prevalence of mutants proves the effective removal of chloroquine from the therapeutic arsenal.

According to Rovira Graels *et al.*, there would be explanatory factors related to the host namely the level of premunition and pharmacokinetics of the molecule of the study [28]. Genetic background as well as diet could also be factors in the variation in therapeutic responses. The epidemiological facies of the city of Massakory, would favor and maintain a significant Anophelian pressure favorable to the circulation of resistant strains as reported by other works [29]. Indeed, in an environment where the Anophelian density is strong and in which the drug pressure to the usual molecules such as chloroquine is high, the risk is great that the infective bites transmit the parasites carrying the resistance mutations.

5. Conclusion

Despite the many efforts made to eradicate it, malaria remains a serious public health problem.

The general objective of this work was to determine the polymorphism of the *pfcr* gene.

Results showed a prevalence of 92.96% of triple mutant IET. This high prevalence reflects the continued use of chloroquine in the study area, although it has been removed from the therapeutic arsenal since 2005.

Ultimately, this study generated clinical and biological data and reported the existence of chloroquine-resistant strains in Massakory. These results challenge the highest health authorities in the country. The government, through the MSPSN and the PNL, must raise awareness for the effective withdrawal of chloroquine. This action will promote on the one hand the re-emergence of parasites sensitive to chloroquine, and on the other hand make possible the reintroduction of chloroquine in the treatment of simple malaria after the suppression of drug pressure.

The high prevalence of IET mutants being restored is alarming, however future work with a large number of samples is recommended for confirmation. This will enable the Government of Chad to find appropriate solutions for the effective treatment of chloroquine in Chad.

Acknowledgements

We would like to thank the Ministry of Health and National Solidarity of Chad and the National Malaria Control Program for making this study possible, as well as all the people who participated in this study.

References

- [1] World Health Organization., (2019). *World malaria report 2019*.
- [2] Noedl, H., Se, Y., Schaefer, K., Smith, B. L., Socheat, D., & Fukuda, M. M. (2008). Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Western Cambodia. *New England Journal of Medicine*, 359 (24), 2619–2620.
- [3] Ashley, E. A., Dhorda, M., Fairhurst, R. M., Amaratunga, C., Lim, P., Suon, S., Sreng, S., Anderson, J. M., Mao, S., Sam, B., Sopha, C., Chuor, C. M., Nguon, C., Sovannaroeth, S., Pukrittayakamee, S., Jittamala, P., Chotivanich, K., Chutasmit, K., Suchatsoonthorn, C., Runchaoen, R., ... Tracking Resistance to Artemisinin Collaboration (TRAC) (2014). Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *The New England journal of medicine*, 371 (5), 411–423.
- [4] Menard, D., & Dondorp, A. (2017). Antimalarial Drug Resistance: A Threat to Malaria Elimination. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 7 (7), a025619.
- [5] Leang R., Bouth D. M., Song L., Tarning J., Char C., Kim S.,., 2015.- Evidence of falciparum malaria multidrug resistance to artemisinin and piperazine in western Cambodia : dihydroartemisinin-piperazine open- label multicenter clinical assessment. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 59, 4719-4726.
- [6] 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, Nhlen NT, Imwong M, Bethell D, Se Y, Lon C, Tyner SD, Saunders DL, Arley F, Mercereau-Puijalon O, Menard D, Newton PN, Khanthavong M, Hongvanthong B, Starzengruber P, Fuehrer HP, Swoboda P, Khan WA, Phyo 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.
- [7] Souleymane ISSA M, Clément KH, Denis MM, et al. (2017) Therapeutic Efficacy of Artesunate-Amodiaquine and Polymorphism of *Plasmodium falciparum* k13-Propeller Gene in Pala (Tchad). *Int J Open Access Clin Trials* 1 (1): 1.
- [8] Issa M., 2018. Efficacité thérapeutique de l'association artésunateamodiaquine et polymorphisme des gènes *dihydrofolate réductase*, *dihydroptéroate synthétase* et *kelch 13 propeller* à Pala (République du Tchad). *Parasitology*. University Félix Houphouët-Boigny (Abidjan, Côte d'Ivoire), 180P.
- [9] Okech B. A., Existe A., Romain J. R., Memnon G., Victor Y. Saint, Rochars M. B. De, *et al.*, 2015.- Therapeutic Efficacy of Chloroquine for the Treatment of Uncomplicated *Plasmodium falciparum* in Haiti after Many Decades of its Use, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 92 (3), 541–545.
- [10] Amaratunga C., Neal A. T. & Fairhurst R. M., 2014.- Flow cytometry-based analysis of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in the ring-stage survival assay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58: 4938–4940.
- [11] Lehane A. M. & Kirk K., 2010.- Efflux of a range of antimalarial drugs and “chloroquine resistance reversers” from the digestive vacuole in malaria parasites with mutant *PfCRT*. *Molecular Microbiology*, 77: 1039–1051.

- [12] Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, Ursos LM, Sihdu AB, Naude B, Deitsch KW, Su X, Wootton JC, Roepe PD, Wellems TE. (2000). Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein *Pfprt* and evidence for their role in chloroquine resistance. *Molecular Cell*, 6, 861-871.
- [13] Singh Sidhu A. B., Verdier-Pinard D. & Fidock D. A., 2002.- Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by *pfert* mutations. *Science*, 298: 210-213.
- [14] Miotto O., Amato R., Ashley E. A., Macinnis B., Dhorda M., Imwong M., *et al.*, 2015. *HHS Public Access*, 47: 226-234.
- [15] Fidock D. A., Ecker A. & Lehane A. M., 2012.- *pfert* and its role in antimalarial drug resistance, *Trends in parasitology*, 28 (11), 504-514.
- [16] Venkatesan M, Alifrangis M, Roper C, Plowe CV (2013). Monitoring antifolate resistance in intermittent preventive therapy for malaria. *Trends in Parasitology*, 29: 497-504.
- [17] Mahamat Moussa Hassane Taïso, Issa Mahamat Souleye, Hamit Mahamat Alio, ..., David Koffi, Offianan André Toure, Djaman Alico Joseph. (2021). Effectiveness and tolerability of the ASAQ versus AL association in Children 6-59 months for the treatment of uncomplicated *P. falciparum* malaria in Massakory (CHAD). *AJBLS*; 9 (5): 259-266.
- [18] Sondo P., Bihoun B., Kabore B., Tahita M. C., Derra K., Rouamba T., *et al.*, (2021).- mutations des gènes de résistance *Pfprt* et *Pfmdr1* dans la zone de Nanoro, Burkina Faso, *Malaria journal*, 1-9.
- [19] Kublin J. G., Cortese J. F., Njunju E. M., Mukadam R. A., Wirima J. J. & Kazembe P. N., (2003).- Reemergence of chloroquine-sensitive *P. falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. *J Infect Dis*, 187: 1870-5.
- [20] Ross L. S., Dhingra S. K., Mok S., Yeo T., Wicht K. J., Kumpornsin K., *et al.*, (2018). Emerging Southeast Asian *PfCRT* mutations confer *Plasmodium falciparum* resistance to the first-line. *Nature Communications*, 25-28.
- [21] Mwanza S., Joshi S., Nambozi M., Chileshe J., Malunga P., Bertin J., *et al.*, (2016).- The return of chloroquine - susceptible *Plasmodium falciparum* malaria in Zambia. *Malaria Journal*, 76: 1-6.
- [22] Mekonnen S. K., Aseffa A., Berhe N., Teklehaymanot T., Clouse R. M., Gebru T., *et al.*, (2014). Return of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* parasites and emergence of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* in Ethiopia, *Malar J*; 13: 244.
- [23] Kiarie W. C., Wangai L., Agola E., Kimani F. T. & Hungu C., (2015).- Chloroquine sensitivity: diminished prevalence of chloroquine - resistant gene marker *pfert* - 76 13 years after cessation of chloroquine use in Msambweni, Kenya. *Malaria Journal*, 1-7.
- [24] Ikegbunam M. N., Nkonganyi C. N., Thomas B. N., Esimone C. O., Velavan T. P. & Ojuronbe O., (2019).- Analysis of *Plasmodium falciparum* *Pfprt* and *Pfmdr1* genes in parasite isolates from asymptomatic individuals in Southeast Nigeria 11 years after withdrawal of chloroquine. *Malaria Journal*, 1-7.
- [25] Oladipo O. O., Wellington O. A. & Sutherland C. J., (2015).- Persistence of chloroquine-resistant haplotypes of *Plasmodium falciparum* in children with uncomplicated Malaria in Lagos, Nigeria, four years after change of chloroquine as first-line antimalarial medicine. *Diagnostic pathology*, 10, 41.
- [26] Djaman J, Ahibo H, Yapi FH, Yapi FH, Bla BK, Ouattara L; Yawo W, N'guessan JD, Yapo A, Mazabraud A (2010). Molecular monitoring of falciparum malaria isolate in côte d'Ivoire: genetic markers (*dhfr-ts*, *dhps*, *pfprt*, *pfmdr-1*) for antimalarial-drugs resistance. *European Journal of Scientific Research*, 40, 461- 470.
- [27] Dagnogo O., Ako A. B., Bla K. B., Dago D. N., Coulibaly N. D., Coulibaly B., *et al.*, (2020). Assessing the polymorphism of DHFR gene from *Plasmodium falciparum* in the south of Cte d'Ivoire. *African Journal of Microbiology Research*, 14: 158-165.
- [28] Rovira-Graells N., Gupta A. P., Planet E., Crowley V. M., Mok S., Pouplana L. R. De, *et al.*, (2012).- Transcriptional variation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Genome Research*, 22: 925-938.
- [29] Nsango S. E., Abate L., Thoma M., Pompon J., Fraiture M., Rademacher A., *et al.*, (2012).- Genetic clonality of *Plasmodium falciparum* affects the outcome of infection in *Anopheles gambiae*. *International journal for parasitology*, 42: 589-595.
- [30] Snounou G., Viriyakosol S., Zhu X., Jarra W., Pinheiro L., Rosario V. do, *et al.*, (1993). High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular and biochemical parasitology*, 61: 315-320.

RESUME

Le paludisme constitue encore de nos jours un grave problème de santé publique malgré les acquis au cours de ces dix dernières années dans la lutte contre cette parasitose. Les enfants de moins de 5 ans constituent les populations les plus vulnérables en zone d'endémie palustre. Le Ministère de la Santé Publique et de la Solidarité Nationale du Tchad, recommande les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine pour la prise en charge du paludisme simple. L'objectif principal de ce travail a été de déterminer d'une part l'efficacité thérapeutique de l'association artésunate-amodiaquine (ASAQ) versus artéméther-luméfántrine (AL) au cours du paludisme simple à *P. falciparum* à Massakory ; d'autre part la prévalence des gènes *pfcr* marqueurs moléculaires de la résistance à la Chloroquine qui reste toujours accessible à la population. L'étude s'est déroulée dans le centre de Massakory I du 14 décembre 2019 au 14 mars 2020 chez les enfants âgés de 6 à 59 mois. Le protocole OMS de 28 jours a été utilisé. Au total 113 patients ont été inclus et randomisés dont 57 dans le groupe Artésunate-Amodiaquine (ASAQ) et 56 dans le groupe Artéméther-Luméfántrine. Parmi eux 103 (91,1%) ont été suivis jusqu'à J28 dont 51 dans le groupe AL contre 52 dans le groupe ASAQ. A l'issue du test d'efficacité thérapeutique les deux CTA ont présenté une RCPA de 100%. Par conséquent tous les patients ont été déclarés guéris à l'issue de ces traitements qui demeurent efficaces dans le site d'étude. Concernant les marqueurs moléculaires de la chloroquine, l'analyse des 71 séquences lisibles sur les 80 échantillons séquencés, indique une fréquence de 92,96% de génotypes **IET** traduisant une résistance à la chloroquine. Le gouvernement à travers le Ministère de la Santé Publique et de la Solidarité Nationale du Tchad doit renforcer la sensibilisation en faveur d'un retrait effectif de la chloroquine.

Mots clé: *Malaria falciparum*, artésunate-amodiaquine, artéméther-luméfántrine, *pfcr*, Chad.

ABSTRACT

Malaria is still a serious public health problem today, despite the achievements made in the fight against this parasitosis over the past ten years. Children under 5 years of age are the most vulnerable populations in malaria-endemic areas. The Ministry of Public Health and National Solidarity of Chad recommends artemisinin-based combination therapies for the management of simple malaria. The main objective of this work was to determine on the one hand the therapeutic efficacy of the combination artesunate-amodiaquine (ASAQ) versus artemether-lumefantrine (AL) during simple malaria with *P. falciparum* in Massakory; on the other hand, the prevalence of *pfcr* genes molecular markers of resistance to Chloroquine which is still accessible to the population. The study took place in the Massakory I center from December 14, 2019 to March 14, 2020 in children aged 6 to 59 months. The 28-days WHO protocol was used. A total of 113 patients were enrolled and randomized, including 57 in the Artesunate-Amodiaquine (ASAQ) group and 56 in the Artéméther-Luméfántrine group. Of these, 103 (91.1%) were followed up to J28, including 51 in the AL group against 52 in the ASAQ group. At the end of the therapeutic efficacy test, the two CTAs had an RCPA of 100%. Therefore, all patients were declared cured at the end of these treatments which remain effective in the study site. Regarding the molecular markers of chloroquine, the analysis of the 71 readable sequences on the 80 sequenced samples, indicates a frequency of 92.96% of **IET** genotypes reflecting resistance to chloroquine. The government through the Ministry of Public Health and National Solidarity of Chad must strengthen awareness an effective withdrawal of chloroquine.

Keywords: *Malaria falciparum*, artesunate-amodiaquine, artemether-lumefantrine, *pfcr*, Chad.