



HAL
open science

Traitement préventif intermittent chez la femme enceinte et chimiorésistances de *Plasmodium falciparum* en Côte d'Ivoire

Offianan André Touré

► **To cite this version:**

Offianan André Touré. Traitement préventif intermittent chez la femme enceinte et chimiorésistances de *Plasmodium falciparum* en Côte d'Ivoire. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Felix Houphouët-Boigny (Abidjan, Côte d'Ivoire), 2012. Français. NNT: . tel-04193111

HAL Id: tel-04193111

<https://hal.science/tel-04193111>

Submitted on 1 Sep 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.

Ministère de l'Enseignement Supérieur
Et de la Recherche Scientifique

République de Côte d'Ivoire
Union Discipline Travail

Université de Cocody



UFR DES SCIENCES MEDICALES

Année : 2012-2013

D-BHT N°

Date de soutenance :
02 /11/2012

THESE UNIQUE
Pour l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE COCODY
EN
BIOLOGIE HUMAINE TROPICALE
OPTION : PARASITOLOGIE-MYCOLOGIE

**TRAITEMENT PREVENTIF INTERMITTENT CHEZ LA
FEMME ENCEINTE ET CHIMIORESISTANCES DE
Plasmodium. falciparum EN CÔTE D'IVOIRE**

Présentée et soutenue publiquement
par
TOURE André Offianan

Composition du jury

M^{me} Dosso Mireille	: Professeur Bactériologie Virologie,	Présidente
M^f Djaman Allico Joseph	: Professeur Biochimie-Parasitologie	Directeur
M^f Ronan Jambou	: Directeur Recherche Parasitologie-Mycologie,	Co-Directeur
M^f NGuessan Jean David	: Maître de conférences, Biochimie-Pharmacologie	Rapporteur
M^f Yavo William	: Maître de Conférences Parasitologie-Mycologie,	Rapporteur
M^f Guinan Jean-Claude	: Professeur Santé Publique,	Examineur

DEDICACES

Je dédie ce travail,

A Dieu notre Seigneur, Dieu de Miséricorde, mille merci pour ta grâce et ta bonté de chaque instant

A mon défunt père Touré Nimbo, je voudrais que là où tu es tu sois toujours fier de ton fils

A ma Mère, Traoré Kagnou, mille merci pour tes prières et tes conseils de chaque instant

A ma défunte Grand-mère Traoré Payominlin, Mille merci pour tout

A ma petite famille : Ma femme Koné Naholaha Lucie et mes deux filles Touré Offianan Laure Manuella Payominlin et Toure Offianan Eliana Marie-Olive Kitanyo

A tous Mes amis

A mes parents pour l'amour et l'éducation que vous m'avez donnés

A mes frères et sœurs, particulièrement Touré Massawonan Severin

A toute ma grande famille

REMERCIEMENTS

*Au Maître, Feu le **Professeur Koné Moussa**. Vous avez dirigé ce travail de bout en bout dans la rigueur scientifique et l'humilité qui vous caractérisaient mais hélas mille fois hélas Allah le Miséricordieux vous a rappelé avant la soutenance de cette thèse. Merci pour les valeurs d'honnêteté, d'humilité et de rigueur dans le travail que vous n'avez cessé de nous inculquer. Nous vous promettons de pérenniser votre immense œuvre sur cette terre des Hommes. Puisse Allah dans son infinie Bonté et sa miséricorde vous recevoir auprès de lui.*

*Au **Professeur Dosso Mireille, Directrice de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Présidente du Jury**. Vous avez marqué l'Institut Pasteur par votre engagement dans la formation des étudiants, votre désir de découvrir et de partager ainsi que votre sens de l'esprit critique. Vous trouverez ici nos remerciements les plus sincères pour votre soutien indéfectible et pour avoir accepté de présider ce jury.*

*Mes remerciements vont au **Professeur Djaman Allico Joseph, Directeur de thèse**, pour avoir accepté spontanément de suppléer Feu le Professeur Koné Moussa et pour avoir participé à ce travail du début à la fin. Vous m'avez toujours ouvert les portes de votre bureau à chaque fois que j'avais besoin de vous. Trouvez ici, l'expression de mes remerciements les plus sincères et de ma profonde gratitude.*

*Je tiens à remercier particulièrement le **Docteur Ronan Jambou**, pour m'avoir initié à la biologie moléculaire (marqueurs de résistance), tests in vitro, microscopie et histologie placentaire à l'Institut Pasteur de Dakar et d'avoir accepté d'être le **Co-Directeur** de cette thèse. Vous voudrez bien trouver dans ces lignes, l'expression de ma profonde gratitude et de mes très sincères remerciements.*

Je tiens à remercier le **Professeur N'Guessan Jean David, Rapporteur**, qui a spontanément accepté d'instruire cette thèse. Vos remarques pertinentes ont permis d'améliorer la qualité de ce document. Vous voudrez bien trouver dans ces lignes, l'expression de ma profonde gratitude et de mes très sincères remerciements.

Je tiens à remercier le **Professeur Yavo William, Rapporteur**, pour avoir accepté d'instruire cette thèse. Vos remarques et suggestions pertinentes ont permis d'améliorer la qualité de ce document. Vous voudrez bien trouver dans ces lignes, l'expression de ma profonde gratitude et de mes très sincères remerciements.

Je remercie le **Pr Guinan Jean Claude**, qui a accepté malgré ses nombreuses occupations de juger ce travail en acceptant d'être **Examineur** dans notre jury. Je vous remercie Professeur pour votre disponibilité. Trouvez ici mes très sincères remerciements.

Je remercie le **Docteur Koné Penali Louis** pour m'avoir inculqué les rudiments de la recherche et de m'avoir donné l'occasion d'approfondir mes connaissances à plusieurs occasions. J'associe à ces remerciements toute l'Unité de Paludologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Merci Beaucoup !!!

Mes remerciements vont au **Professeur Carol Sibley Hopkins** qui a participé financièrement à cette étude et nous a ouvert les portes de son laboratoire pour l'analyse moléculaire de ce travail. Trouvez ici, Professeur, l'expression de mes très sincères remerciements et de ma profonde gratitude. Merci encore !!!

Mes remerciements vont au **Professeur Ehouman Armand** qui a été le Maître de mon Maître et qui me fait toujours l'honneur de me recevoir à chaque fois que je le sollicite. Trouvez ici, Professeur, l'expression de mes très sincères remerciements et de ma profonde gratitude. Merci encore !!!

Mes remerciements vont également au Dr Demba Sarr pour son implication dans ce travail du début à la fin mais aussi et surtout pour son aide dans l'analyse statistique des résultats.

Mes remerciements vont aussi aux Docteurs Coulibaly M'Lanhoro Ange Aristide, Tiacoh Landry N'Guessan, Kouame Menan Gerard, Adingra Ahoua Patrice, aux Doctorants Ako Ako Aristide Bérenger, Coulibaly Baba, Adji Gbessi Eric, Traoré Rokja, Koffi David, aux Techniciens Martin Gbaguidi, Soumahoro Adama, Issiaka Bassinka, Kobenan Kra, Coulibaly Korona, Yao Amani Salomon, Bakayoko Fatoumata Amcharde pour votre participation active à ce travail. Trouvez ici l'expression de mes remerciements les plus sincères.

J'adresse mes sincères remerciements aux Sages Femmes et aux Autorités Sanitaires de la FSUCOM d'Anonkoua-kouté, de la Formation Sanitaire Urbaine de Yopougon Attié, des Hôpitaux généraux de Koumassi et de Bonoua, des Centre de Santé Ruraux de Yaou et de Samo pour m'avoir soutenu dans la réalisation de ce travail. Merci infiniment à vous.

A Lath Delalie, Allou Patricia, Traore Djelia, pour votre disponibilité, votre engagement dans le travail. Je ne saurai trouver les mots pour vous remercier.

Au Réseau des Instituts Pasteurs et Instituts Associés pour son appui financier à la réalisation de ce travail dans le cadre du projet FSP.

Au Directeur du PNLSP San Koffi et aux docteurs Assi Serge Brice, Kadjo Florence pour le soutien financier apporté par le PNLSP

Au Directeur Départemental de la Santé de Grand-Bassam, Dr Dagnogo levoltchin. Merci encore pour tout. Vous m'avez accueilli ainsi que l'équipe de recherche à bras ouvert dans votre District.

Merci pour tout à Mr et Mme Mandjoba pour votre aide et vos conseils.

Merci infiniment à Mr Yves Yao Kouamé pour vos encouragements de tous les jours.

Merci pour tout à Lohoues Essane Flore Lizette pour ton aide si précieuse et tes conseils.

Merci à tout le personnel de la Plateforme de Biologie Moléculaire en particulier aux Docteurs Ekaza Euloge et Ngazoa Solange. Veuillez trouver ici mes remerciements les plus sincères et toute ma reconnaissance pour tout ce que nous avons partagé ensemble durant mon séjour sur la plateforme.

Toute notre reconnaissance et notre gratitude au projet FSP dont le financement a été d'un apport inestimable pour la réalisation de ce travail.

Merci à tout le personnel de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire en particulier tout le personnel du Département de Parasitologie Mycologie. Je vous remercie pour votre soutien indéfectible.

A tous ceux qui de près ou de loin ont participé à la réalisation de ce travail et que je n'ai pas nommément cités Soyez-en infiniment remerciés.

TABLE DES MATIERES

DEDICACES	i
REMERCIEMENTS	ii
LISTE DES ABREVIATIONS	x
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	xiii
INTRODUCTION GENERALE	1
Prémière partie : GENERALITES SUR LE PALUDISME	7
I.EPIDEMIOLOGIE	8
I.1. Situation de la maladie	8
I.1.1.Dans le monde	8
I.1.2.En Afrique	8
I.1.3.En Côte d'Ivoire	9
I.2. Agents pathogènes et spécificités	11
I.2.1. Définition	11
I.2.1.Taxonomie	11
I.2.3. Morphologie et cycle évolutif	11
II. PALUDISME ET GROSSESSE	16
II.1. Epidémiologie du paludisme chez la femme enceinte	16
II.2. Physiopathologie du paludisme chez la femme enceinte	19
II.3. Placenta	21
II.3.1. Structure du placenta	21
II.3.2. Aspect macroscopique	22
II.3.3. Circulation sanguine dans le placenta	22
II.3.4. Fonctions placentaires	23
II.4. Immunité antipalustre acquise chez la femme enceinte	26
II.4.1. Réponses immunes à l'infection placentaire	26
II.4.2. Anticorps anti- adhésion	27
II.4.3. Immunité cellulaire	28
III. PRINCIPALES FAMILLES D'ANTIPALUDIQUES	29
III.1. Famille des lysomotropes	29
III.1.1. Dérivés de l'artémisinine	29

III.1.2. Amino-alcools	30
III.1.3. Amino-4-quinoléines	30
III.2. Famille des antimétabolites	30
III.3. Antibiotiques à activité antipaludique	32
III.4. Antipaludiques et grossesse	32
IV. CHIMIORESISTANCES	34
IV.1. .Historique et situation actuelle	34
IV.2. Résistance aux lysomotropes	37
IV.2.1. Mécanisme d'action	37
IV.2.2. Mécanisme de résistance	37
IV.3. Résistance aux antimétabolites	41
IV.3.1. Mécanisme d'action	41
IV.3.2. Mécanisme de résistance	41
IV.4. Résistance aux artémisinines	45
IV.4.1. Mécanisme d'action	45
IV.4.2. Mécanisme de résistance	46
IV.5. Dynamique des résistances	47
IV.6. Facteurs favorisant les chimiorésistances	49
IV.6.1. Pression médicamenteuse	49
IV.6.2. Hyperparasitémie	49
IV.6.3. Intensité de la transmission palustre	50
IV.6.4. Mouvements migratoires	51
IV.7. Méthodes d'étude des chimiorésistances	51
IV.7.1. Tests <i>in vivo</i>	51
IV.7.2. Tests <i>in vitro</i>	52
IV.7.3. Marqueurs moléculaires de résistance	53
Deuxième partie : NOS TRAVAUX DE RECHERCHE	55
Chapitre I: Caractérisation moléculaire des gènes <i>pfdhfr</i> , <i>pfdhps</i> et <i>pfcr1</i> à Anonkoua-kouté, Bonoua et Samo	56
Introduction	57
I. MATERIEL ET METHODES	59
I.1. Matériel	59
I.1.1. Type et période d'étude	59
I.1.2. Sites d'étude	59

I.1.3. Population d'étude	61
I.1.4. Matériel biologique	61
I.1.5. Gènes étudiés et amorces correspondantes	61
I.2. Méthodes	65
I.2.1. Collecte de sang sur papier filtre Whatmann 3MM	65
I.2.2. Découpage des spots de papier filtre et plan de plaque	66
I.2.3. Extraction de l'ADN génomique de <i>Plasmodium falciparum</i>	66
I.2.4. Amplification des gènes par PCR	68
I.2.5. Electrophorèse classique	70
I.2.6. Séquençage des produits PCR	71
I.2.7. Analyse des séquences	72
I.2.8. Analyses statistiques	74
I.2.9. Considérations éthiques et réglementaires	75
II. RESULTATS	76
III. DISCUSSION	95
CONCLUSION	108

Chapitre II : Efficacité comparée du Traitement Préventif Intermittent non contrôlé <i>versus</i> contrôlé avec la sulfadoxine-pyriméthamine (TPI) chez les femmes enceintes en zones de résistance élevée à la SP de Côte d'Ivoire	109
---	-----

Introduction	110
I. MATERIEL ET METHODES	113
I.1. Matériel	113
I.1.1. Type et durée de l'étude	113
I.1. 2. Zones d'étude	113
I.1. 3. Population d'étude	114
I.1. 4. Taille de l'échantillon	114
I.2. Méthodes	115
I.2.1. Au screening	115
I.2.2. A l'inclusion	116
I.2.3. Randomisation et mode d'administration des traitements	116
I.2.4. Suivi des participantes	118
I.2.5. Procédures de laboratoire	119
I.2.6. Prise en charge des cas de paludisme et d'anémie	119
I.2.7. Critères d'efficacité	120

I.2.8. Evaluation de la Tolérance du médicament	120
I.2.9. Gestion et Analyses statistiques des données	121
I.2.10. Considérations éthiques et réglementaires	122
II. RESULTATS	124
III. DISCUSSION	142
CONCLUSION	150

Chapitre III : Efficacité thérapeutique et tolérance des associations Artesunate-amodiaquine
versus Artéméther-luméfantrine en Côte d'Ivoire au cours du paludisme non compliqué à

<i>P. falciparum</i>	152
Introduction	153
I. MATERIEL ET METHODES	156
I.1. Type et période d'étude	156
I.2. Sites d'étude	156
I.3. Population d'étude	158
I.4. Taille de l'échantillon	160
I.5. Randomisation et traitement	160
I.6. Suivi clinique et parasitologique	161
I.7. Procédures de laboratoire	162
I.8. Analyse statistique des données	167
I.9. Considérations éthiques et réglementaires	167
I.10. Critères de jugement de la réponse thérapeutique	168
II. RESULTATS	169
III. DISCUSSION	178
CONCLUSION	182
CONCLUSION GENERALE	183
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	188
ANNEXES ET PUBLICATIONS	

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN :	Acide Désoxyribo Nucléique
Ala :	Alanine
AQ :	Amodiaquine
AM :	Amantadine
Arg :	Arginine
Asn :	Asparagine
ATP :	Adénine Triphosphate
CD :	Cluster de Différentiation
CI50 :	Concentration Inhibitrice 50 %
CI90 :	Concentration Inhibitrice 90 %
CPN :	Consultation Périnatale
CQ :	Chloroquine
CQR:	Chloroquinorésistant
CQS:	Chloroquinosensible
Crt:	Chloroquine Resistance Transporter
CSA :	Chondroïtine Sulfate A
CSR :	Centre de Santé Rurale
CTA:	Combinaison Thérapeutique à base des dérivés de l'Artémisinine
DHFR-TS :	Dihydrofolate Réductase Thymidilate Synthétase
DHPS :	Dihydroptéroate Synthétase
DOT :	Direct Observation Therapy
EDTA :	Ethylène Diamine Trétra Acétate
ECT :	Echec Clinique Tardif
ELISA :	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPT :	Echec Parasitologique Tardif
ETP :	Echec Thérapeutique Précoce
ETT :	Echec Thérapeutique Tardif
FSUCOM :	Formation Sanitaire à Base Communautaire
FSUY-A :	Formation Sanitaire Urbaine Yopougon- Attié
GPARC :	Global Plan for Artemisinin Resistance Containment

Glu :	Glucose
Gly :	Glycine
GMP :	Good Manufactory Practice
Hb :	Hémoglobine
HRP2 :	Histidin Rich Protein 2
ICAM :	Intercellular Adhesion Molecule
IFN :	Interféron
IgG :	Immunoglobuline G
ICT :	Test Immunochromatographique
IL :	Interleukine
Ile :	Isoleucine
ITT :	Intention de Traiter
Leu :	Leucine
Lys :	Lysine
Met :	Méthionine
MII :	Moustiquaire Imprégnée d’Insecticides
MITT :	Modofied Intention to Treat
MMV :	Medicines for malaria Venture
MQ :	Mefloquine
msp1 :	Merozoite Surface Protein 1
msp2 :	Merozoite Surface Protein 2
NFS :	Numération Formule Sanguine
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PABA :	Acide para-amino-benzoïque
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PCR-RFLP :	Polymerase Chain Reaction Restriction fragment Length Polymorphism
Pfprt :	<i>Plasmodium falciparum</i> chloroquine resistance transporter
Pfdhfr:	<i>Plasmodium falciparum</i> Dihydrofolate Réductase
Pfdhfr-ts:	Dihydrofolate reductase-thymidilate synthetase
Pfdhps:	<i>Plasmodium falciparum</i> Dihydroptéroate Synthetase
Pfmdr1 :	<i>Plasmodium falciparum</i> multidrug resistance 1
Pfctcp:	<i>Plasmodium falciparum</i> Translationally Controlled Tumor Protein
Phe:	Phenylalanine
LDH:	Lactate déshydrogénase

PNLP :	Programme National de Lutte contre le Paludisme
PP:	Per- Protocole
PPN:	Petit Poids de Naissance
PQ:	Primaquine
PTME :	Prévention de la Transmission Mère Enfant
QD :	Quinidine
QN :	Quinine
RCIU :	Retard de Croissance Intra-Utérin
RCPA :	Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate
Ser :	Sérine
SNP :	Single Nucleotide Polymorphism
SP :	Sulfadoxine Pyriméthamine
TBE:	Tris Borate EDTA
TDR :	Test de Diagnostic Rapide
TGFβ:	Tissue Growth Factor β
TH1:	Helper type 1
TH2:	Helper type 2
TNF:	Tumor Necrosis Factor
TPI:	Traitement Préventif Intermittent
TPI-sp:	Traitement Préventif Intermittent sulfadoxine-pyriméthamine
TV:	Toucher Vaginal
Tyr:	Tyrosine
WHO:	World Health Organization

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

FIGURES

Figure 1 : Pays et territoires affectés par le paludisme en 2010.....	10
Figure 2 : Cycle évolutif de <i>Plasmodium</i>	15
Figure 3: Situation de la résistance de <i>P. falciparum</i> aux différentes molécules utilisées en 2004	36
Figure 4 : Topologie et fonction de la PfCRT	40
Figure 5 : Prévalence du triple mutant <i>pfdhfr</i> (N51I, C59R, S108N) en Afrique	43
Figure 6 : Prévalence du double mutant <i>pfdhps</i> (A437G, K540E) en Afrique.....	44
Figure 7 : Localisation géographique des sites d'étude	60
Figure 8 : Répartition des isolats selon le génotype à Anonkoua-kouté	82
Figure 9: Fréquence des mutations des codons des gènes <i>pfdhfr</i> , <i>pfdhps</i> et <i>pfert</i> des isolats de <i>P. falciparum</i> à Anonkoua-kouté	84
Figure 10 : Répartition des isolats selon le génotype à Bonoua	90
Figure 11 : Répartition des isolats selon le génotype à Samo.....	91
Figure 12 : Fréquence des mutations des codons des gènes <i>pfdhfr</i> , <i>pfdhps</i> et <i>pfert</i> des isolats de <i>P. falciparum</i> à Bonoua	92
Figure 13 : Fréquence des mutations des codons des gènes <i>pfdhfr</i> , <i>pfdhps</i> et <i>pfert</i> des isolats de <i>P. falciparum</i> à Samo.....	93
Figure 14 : Fréquence des mutations des codons des gènes <i>pfdhfr</i> , <i>pfdhps</i> et <i>pfert</i> des isolats de <i>P. falciparum</i> à Bonoua et Samo	94
Figure 15 : Profil de l'essai clinique	126

Figure 16 : Distribution du poids de naissance à l'accouchement dans les deux groupes	129
Figure 17 : Distribution du poids de naissance à l'accouchement dans les deux groupes selon la parité.....	130
Figure 18: Distribution de l'hémoglobine dans les deux groupes	135
Figure 19: Distribution de l'hémoglobine dans les deux groupes selon la parité	136
Figure 20: Répartition des effets secondaires indésirables dans les deux groupes	141
Figure 21: Localisation géographique des sites d'étude	157
Figure 22 : Profil clinique de l'essai.....	169
Figure 23: Proportion des patients avec fièvre au cours du suivi	171
Figure 24: Proportion des patients avec des plasmodies au cours du suivi.....	172
Figure 25: Proportion des patients avec des gamétocytes au cours du suivi	173
Figure 26: Electrophorégramme des familles alléliques 3D7 et FC27.....	176

TABLEAUX

Tableau I : Amorces utilisées pour la PCR conventionnelle et pour la Nested PCR _____	63
Tableau II : Amorces utilisées pour le séquençage _____	64
Tableau III : Programmes d'amplification _____	69
Tableau IV: Nombre de fragments d'ADN de <i>P. falciparum</i> séquencés provenant de sujets asymptomatique et symptomatiques _____	77
Tableau V : Distribution des mutations pures et mixtes des gènes <i>pfdhfr</i> , <i>pfdhps</i> et <i>pfcr1</i> ____	78
Tableau VI : Prévalence des génotypes des gènes <i>pfdhfr</i> , <i>pfdhps</i> et <i>pfcr1</i> à Anonkoua-kouté _____	81
Tableau VII : Prévalence des allèles mixtes des gènes <i>pfdhfr</i> , <i>pfdhps</i> et <i>pfcr1</i> _____	83
Tableau VIII: Allèles <i>pfdhfr/pfdhps</i> associés à Anonkoua-kouté _____	85
Tableau IX: Nombre de fragments d'ADN de <i>P. falciparum</i> séquencés provenant de sujets symptomatiques à Bonoua et Samo _____	86
Tableau X: Distribution des mutations pures et mixtes des gènes <i>pfdhfr</i> , <i>pfdhps</i> et <i>pfcr1</i> ____	87
Tableau XI : Prévalence des génotypes des gènes <i>pfcr1</i> , <i>pfdhfr</i> et <i>pfdhps</i> à Samo et Bonoua _____	89
Tableau XII: Caractéristiques sociodémographiques à l'inclusion _____	127
Tableau XIII: Proportion des femmes ayant accouché d'un enfant de Petit Poids de Naissance (<2500g) selon la gestité _____	131
Tableau XIV: Proportion des femmes ayant accouché d'un enfant de PPN (<2500g) selon la parité _____	132
Tableau XV: Prévalence de l'infestation palustre placentaire et de l'anémie selon la gestité dans les deux groupes _____	137
Tableau XVI: Incidence de la fièvre, de la parasitémie et de l'anémie selon la parité dans les deux groupes _____	138

Tableau XVII: Prévalence du paludisme congénital, de la prématurité, de l'avortement spontané et des morts nés dans les deux groupes _____	139
Tableau XVIII: Concentrations des réactifs et volumes réactionnels PCR-I _____	163
Tableau XIX: Amorces pour la PCR-I _____	163
Tableau XX: Programme d'amplification MSP-2 _____	164
Tableau XXI : Concentrations des réactifs et volumes réactionnels PCR-II _____	165
Tableau XXII : Amorces pour la PCR II _____	165
Tableau XXIII : Programme d'amplification pour les familles FC27/3D7 de MSP-2 _____	166
Tableau XXIV : Caractéristiques des patients à l'inclusion _____	170
Tableau XXV : Réponse thérapeutique de l'artésunate-amodiaquine et de l'artéméthér- luméfantrine à J28 _____	174
Tableau XXVI : Réponse thérapeutique à J28 selon le site d'étude en analyse PP _____	175
Tableau XXVII : Répartition des effets secondaires dans les deux groupes _____	177

INTRODUCTION GENERALE

Introduction

A ce jour le paludisme reste la première cause de morbidité et de mortalité dans le monde. Quelques 3,2 milliards de personnes vivent dans les zones à risque de transmission palustre. Approximativement 216 millions de cas cliniques (entre 149 et 274 millions) sont survenus en 2010 avec 655 000 cas de décès (entre 537 000 et 907 000) et la plupart d'entre eux sont dus à *Plasmodium falciparum* (WHO, 2011). Les schémas de transmission et de morbidité varient énormément selon les régions et à l'intérieur d'un même pays (WHO, 2009). Ces variations tiennent aux différences entre les parasites et les moustiques vecteurs, aux conditions écologiques qui influent sur la transmission et à des facteurs économiques comme la pauvreté et l'accès aux soins et aux services de prévention efficaces. Dans les pays Africains d'endémie, le paludisme est à l'origine de 25 à 35% des consultations ambulatoires, de 20 à 45% des hospitalisations et de 15 à 35% des décès à l'hôpital, faisant ainsi peser une lourde charge sur les systèmes de santé déjà fragiles (WHO, 2009). Les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes constituent les populations les plus vulnérables et paient un lourd tribut.

L'infestation palustre pendant la grossesse est un problème de santé publique majeur survenant dans toutes les régions tropicales et subtropicales.

En Afrique, environ 30 millions de femmes enceintes vivent dans les régions impaludées dont la plupart dans des zones de transmission stable (Dellicour *et al.*, 2010). Les conséquences du paludisme au cours de la grossesse sont dramatiques aussi bien pour la mère que pour l'enfant à naître. Ainsi le paludisme est une cause fréquente d'anémie chez la femme enceinte, de mort maternelle, de faible poids de naissance chez l'enfant, de prématurité et de mortalité infantile (Sarr *et al.*, 2006, WHO, 2006 ; Menendez *et al.*, 2010). Pour réduire ces conséquences néfastes associées au paludisme au cours de la grossesse, l'OMS recommande la prévention par le Traitement Préventif Intermittent (TPI) et les Moustiquaires Imprégnées d'Insecticides (MII) pour les

femmes enceintes vivant dans les zones de transmission stable à *P. falciparum*. Ce TPI implique la prise d'au moins deux doses de traitement d'un antipaludique efficace comme la Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP) durant les consultations prénatales de routine à toutes les femmes vivant dans ces zones. Le TPI constitue depuis une stratégie essentielle de l'OMS pour des grossesses à moindre risque. Il a été introduit dans plus de 26 pays Africains dont la Côte d'Ivoire en 2005. Cependant peu d'études portant sur les effets bénéfiques du TPI et la prévalence de l'infestation palustre placentaire ont été conduites dans notre pays avant et même après l'adoption de cette stratégie (Vanga-Bosson *et al.*, 2010).

Aujourd'hui, la chimioprophylaxie antipalustre de la femme enceinte est donc une constante de tous les programmes nationaux de lutte des pays d'endémie. Si l'on excepte les voyageurs résidant de façon transitoire dans une zone d'endémie, les femmes enceintes constituent aujourd'hui, la seule population recevant une chimioprophylaxie antipalustre. Cette prophylaxie a largement prouvé son efficacité (diminution de la morbidité, diminution des accès palustres, diminution de l'anémie maternelle, augmentation du poids de naissance de l'enfant entre autres) dans les régions où ce médicament est encore efficace (Sirima *et al.*, 2006, Tiono *et al.*, 2009 ; Sridaran *et al.*, 2010).

Des études conduites dans différentes régions de la Côte d'Ivoire et particulièrement à Abidjan ont montré des taux relativement élevés d'échec thérapeutique à la sulfadoxine-pyriméthamine ainsi qu'une prévalence élevée des mutations associées à des gènes de résistance à ce médicament (Djaman, 2003 ; Penali *et al.*, 2009 ; Djaman *et al.*, 2010). Le phénomène est plus grave pour la chloroquine d'où l'abandon de cette molécule en traitement de première intention et en traitement prophylactique antipalustre chez la femme enceinte depuis 2003 (Anonyme, 2008). Cinq années après cet arrêt, il serait intéressant de voir le niveau actuel de résistance de *P.falciparum* à la chloroquine. En cas

de reversion de la chloroquino-résistance, cette molécule pourrait être à nouveau utile en chimioprophylaxie et en traitement curatif du paludisme.

En Côte d'Ivoire et ailleurs en Afrique, le niveau de résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine (Djaman, 2003 ; Djaman *et al.*, 2007 ; Penali *et al.*, 2009), pourrait donc remettre en cause son efficacité en TPI chez la femme enceinte. En effet, contrairement aux protocoles de traitement des malades, il est difficile de prévoir l'efficacité de la prophylaxie dans une région où existent déjà des souches plasmodiales résistantes. Ainsi le niveau de résistance à partir duquel le TPI avec la SP serait inefficace reste une inconnue. Cela impose de ce fait non seulement une évaluation régulière et continue de la SP mais également la recherche de nouvelles stratégies de prévention du paludisme chez la femme enceinte. On dénombre parmi ces stratégies l'évaluation de nouvelles molécules en TPI dans cette population à risque.

Ainsi des études sur de potentiels candidats au TPI chez la femme enceinte sont en cours et les dérivés de l'artémisinine seraient une alternative intéressante à la SP. Mais des travaux récents ont mis en évidence une résistance de *P. falciparum* aux dérivés de l'artémisinine à la frontière Thaïlando-Cambodgienne créant l'inquiétude dans la communauté scientifique (Noedl *et al.*, 2008 ; Dondorp *et al.*, 2009 ; WHO, 2009 ; Dondorp *et al.*, 2010). En effet une extension de la résistance aux dérivés de l'artémisinine compromettrait gravement les acquis de la lutte contre ce fléau ces dix dernières années. Plusieurs facteurs notamment la persistance des monothérapies et l'usage à grande échelle de CTA contrefaites favoriseraient l'émergence de la résistance aux dérivés de l'artémisinine (Legris, 2005 ; Granado *et al.*, 2009 ; Newton *et al.*, 2010). Malheureusement ces facteurs de risque sont réunis dans notre pays où les dérivés de l'artémisinine sont déployés depuis plusieurs années faisant craindre une émergence de la résistance de *P. falciparum* à ces molécules.

Pour résoudre les problèmes soulevés ci-dessus, il est nécessaire d'apporter des réponses aux questions reliant chimiorésistance et TPI chez la femme enceinte.

Ainsi notre travail s'est articulé autour de trois principales questions:

1. Quel est le niveau de résistance de *P. falciparum* à la SP et à la CQ en Côte d'Ivoire?
2. Le Traitement Préventif Intermittent avec la SP serait-il encore efficace en cas de résistance élevée de *P. falciparum* à ce médicament?
3. Existe-t-il une émergence de la résistance aux dérivés de l'artémisinine candidats potentiels au TPI chez la femme enceinte, après plusieurs années d'utilisation dans notre pays?

Nous nous proposons dans ce travail de vérifier les hypothèses suivantes :

- le niveau de résistance de *P. falciparum* à la SP serait encore élevée malgré son retrait en traitement curatif du paludisme simple en Côte d'Ivoire en 2005. La situation serait de même pour la CQ;
- la SP correctement prise en TPI chez la femme enceinte serait encore efficace contre *P. falciparum* malgré probablement une résistance élevée de *P. falciparum*. Dans ce cas il y'aura peu de parasites placentaires à l'accouchement chez les femmes ayant été correctement prises en charge lors des Consultations Périnatales (CPN). Il s'en suivra chez ces femmes, des prévalences moins importantes de faible poids de naissance, d'anémie maternelle, de prématurité, d'avortement et de morts nés;
- malgré l'émergence de la résistance de *P. falciparum* aux dérivés de l'artémisinine à la frontière thaïlanno-cambodienne et l'existence de facteurs de risque d'émergence persistants depuis plusieurs années dans notre pays, les dérivés de l'artémisinine en association seraient encore efficaces et pourraient éventuellement être une alternative à la SP en cas d'inefficacité de cette dernière en TPI.

Par conséquent le but de ce travail est de vérifier si la stratégie par la SP lors du TPI est effective, efficace, et peut encore être maintenue en Côte d'Ivoire

pendant quelques années. On pourra donc disposer d'importantes données cliniques et biologiques comparables à d'autres zones géographiques. Ces informations seront essentielles à la fois aux différentes unités de recherche qui travaillent en amont, mais aussi aux équipes d'intervention qui travaillent en aval, afin de suivre, contrôler et guider au mieux la lutte contre le paludisme et plus particulièrement le paludisme au cours de la grossesse.

Il permettra également au cours de sa réalisation d'attirer l'attention des femmes sur l'importance de respecter toutes les CPN recommandées pour une grossesse saine avec moins de risque dans les zones d'endémie palustre.

Le suivi et l'évaluation du TPI sont donc essentiels aussi bien pour son effectivité mais aussi et surtout pour son efficacité.

Pour la réalisation de ce travail les objectifs suivants ont été définis:

Objectif général

Evaluer l'efficacité du TPI par la SP en rapport avec le niveau de résistance de *P.falciparum* à certains antipaludiques (SP, CQ).

Objectifs spécifiques

1. Déterminer les mutations des gènes *dhfr*, *dhps* et *crt* des souches plasmodiales des zones d'étude.
2. Déterminer la prévalence du faible poids de naissance chez les femmes sous TPI, de l'infestation palustre placentaire, de la prématurité, de l'avortement et des morts nés après l'introduction du TPI il y'a quelques années.
3. Déterminer l'efficacité thérapeutique et la tolérance des combinaisons thérapeutiques à base de dérivés de l'artémisinine chez les sujets souffrant de paludisme non compliqué à *P. falciparum*.

*PREMIERE PARTIE : GENERALITES
SUR LE PALUDISME*

I. EPIDEMIOLOGIE

Le paludisme est une érythrocytopathie due à un hématozoaire du genre *Plasmodium* transmis à l'homme par la piqûre d'un moustique vecteur du genre *Anopheles* dont seule la femelle transmet la maladie.

I.1. Situation de la maladie

I.1.1. Dans le monde

La zone géographique impaludée s'est considérablement rétrécie depuis 50 ans. Mais la lutte contre cette maladie devient de plus en plus difficile et les acquis se sont peu à peu érodés.

Le paludisme pose aujourd'hui un problème majeur de santé publique dans plus de 90 pays représentant au total quelque 2,4 milliards de personnes, soit 40 % de la population mondiale. L'incidence mondiale de la maladie est estimée à 149 - 274 millions de cas cliniques en 2010. Plus de 90 % de tous les cas de paludisme surviennent en Afrique subsaharienne. La mortalité due au paludisme a été évaluée entre 537 000 et 907 000 de morts en 2010 ([WHO, 2011](#)).

I.1.2. En Afrique

L'immense majorité des décès dus au paludisme surviennent en Afrique, au sud du Sahara, où cette maladie fait aussi sérieusement obstacle au développement économique et social. On estime à plus de 12 milliards la perte annuelle de PIB due au paludisme en Afrique, alors qu'une fraction de cette somme suffirait à le maîtriser ([WHO, 2010](#)).

Le paludisme est la principale cause de mortalité chez les enfants de moins de cinq ans en Afrique (20%) et il représente 10% de la charge totale de morbidité du continent. Il est responsable de 40% des dépenses de santé publique, de 30-50% des admissions dans les hôpitaux et de plus de 50% des consultations externes dans les zones de forte transmission ([WHO, 2009](#)).

Le paludisme affecte essentiellement l'Afrique, et ce pour plusieurs raisons. La plupart des cas de paludisme en Afrique subsaharienne sont dus à *Plasmodium falciparum*, la forme la plus grave de la maladie car potentiellement mortelle. Cette région héberge aussi les espèces de moustiques les plus efficaces. 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.

La résistance aux antipaludiques bon marché tels que la chloroquine et la SP a été pour beaucoup dans l'augmentation de la morbidité et de la mortalité palustre sur le continent ([WHO, 2010](#)).

I.1.3. En Côte d'Ivoire

Le paludisme représente la première cause de mortalité (10%) et de morbidité (40%) dans la population générale. Les enfants âgés de moins de 5 ans et les femmes enceintes sont les plus touchés et payent un lourd tribut à la maladie. Ce fléau est responsable d'absentéisme scolaire (40%) et professionnel (42 %), de baisse de productivité agricole ou industrielle ([Anonyme, 2008](#)).

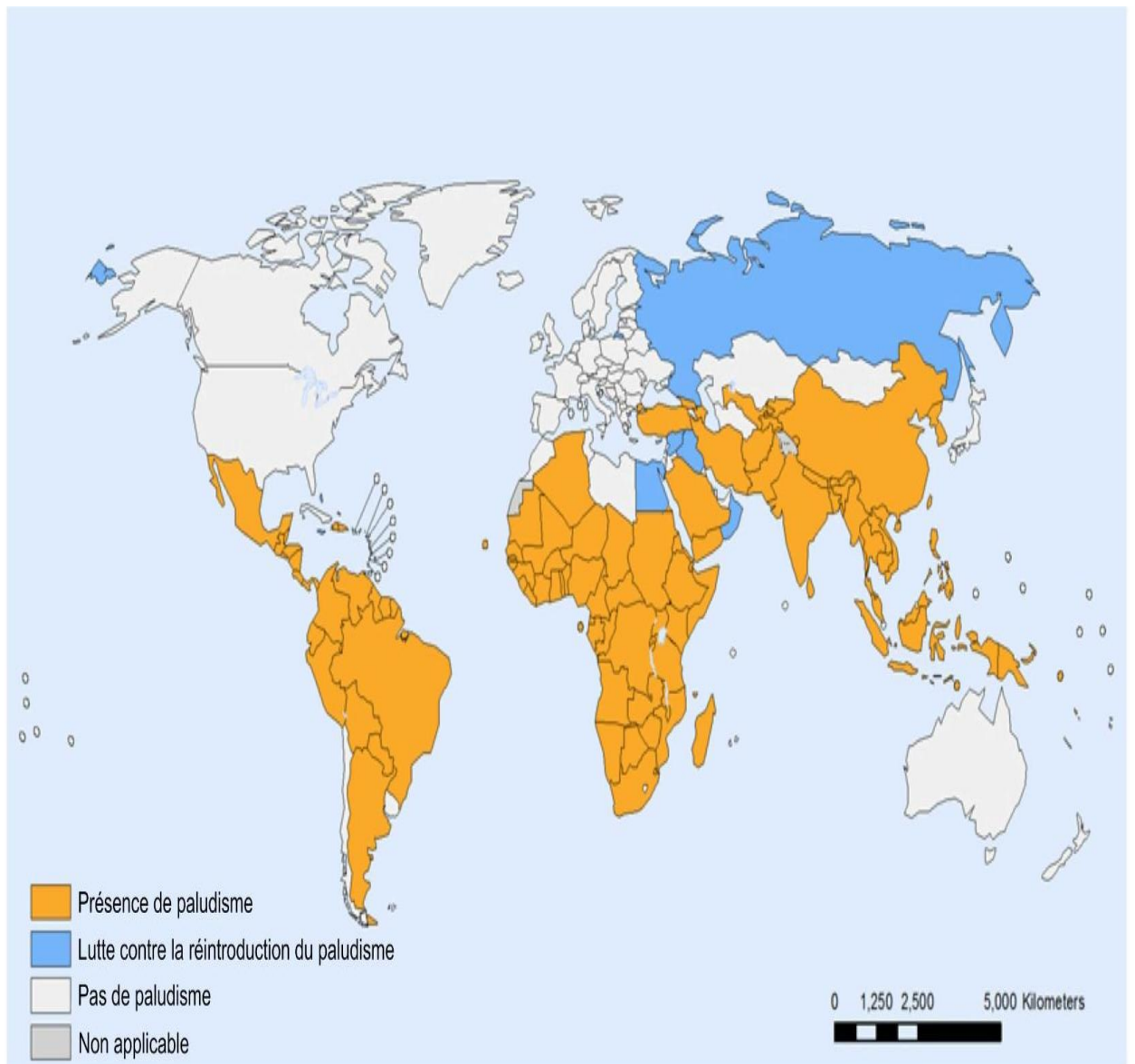


Figure 1 : Pays et territoires affectés par le paludisme en 2010.

http://www.who.int/gho/malaria/malaria_003.jpg Consulté le 15 Juin 2012

I.2. Agents pathogènes et spécificités

I.2.1. Définition

Le *Plasmodium* est un protozoaire polymorphe intra-érythrocytaire de 2 à 5 micromètres de diamètre dont la multiplication est asexuée (ou schizogonique) chez l'homme et sexuée (ou sporogonique) chez le moustique vecteur, l'anophèle femelle ((Bogitsh & Cheng, 1998).

I.2.2. Taxonomie (Gentilini, 1993)

Les agents pathogènes sont des protozoaires appartenant :

- Au phylum des *Apicomplexa* ;
- A la classe des *Sporozoea* ;
- A la sous classe des *Coccidia* ;
- A l'ordre des *Eucoccidiida* ;
- Au sous ordre des *Haemosporina* ;
- Au genre *Plasmodium*.

Cinq espèces parasitent l'homme:

- *Plasmodium falciparum* ;
- *Plasmodium malariae* ;
- *Plasmodium vivax* ;
- *Plasmodium ovale* ;
- *Plasmodium knowlesi*.

I.2.3. Morphologie et cycle évolutif (Mouchet *et al.*, 2004, OMS, 2011)

La morphologie du parasite change sans cesse dans son aspect et sa taille, au cours du cycle biologique. Les plasmodies sont des parasites intracellulaires dont la multiplication nécessite un hôte intermédiaire vertébré (Homme) où se

déroule le cycle asexué ou schizogonie, et un hôte définitif invertébré (anophèle) chez qui se déroule la multiplication sexuée ou sporogonie.

1.2.3.1. Chez l'homme

Au cours d'une piqûre chez l'Homme, l'anophèle femelle infesté injecte avec sa salive dans un vaisseau sanguin, des sporozoïtes (éléments fusiformes de 8 à 12 micromètres de diamètre) localisés dans ses glandes salivaires. Ces sporozoïtes se répartissent rapidement dans tout l'organisme, pénétrant activement et indifféremment dans différents types cellulaires. Seuls les sporozoïtes ayant gagné le foie et franchis une dernière barrière constituée par les cellules de Küpffer, poursuivent leur cycle : c'est la schizogonie tissulaire ou cycle exo-érythrocytaire. Après sa pénétration dans l'hépatocyte, le sporozoïte s'arrondit, se transformant en un élément uninucléé de quelques microns de diamètre appelé cryptozoïte. Deux possibilités d'évolution s'offrent alors à ce dernier :

- **une évolution immédiate** où le cryptozoïte grossit, son noyau et son cytoplasme se divisent. Après plusieurs divisions, il va se former au bout d'une à trois semaines un schizonte mature ou « corps bleu » volumineux (40 à 100 μm) contenant quelques milliers de noyaux déformant l'hépatocyte hôte. L'éclatement du « corps bleu » libère de nombreux mérozoïtes qui gagnent le sang circulant pour initier la phase érythrocytaire du cycle schizogonique ;
- au cours de **la seconde évolution dite retardée**, le cryptozoïte hépatique grossit légèrement mais reste sous une forme uninucléée quiescente appelée hypnozoïte. Celle-ci sera activée à des périodes variables selon la souche et l'espèce plasmodiale donnant alors lieu à une schizogonie hépatique « classique ». L'existence de formes hypnozoïtes chez *P. ovale* et *P. vivax* explique les rechutes observées avec ces espèces.

P. falciparum et *P. malariae* ne possèdent pas ces formes. Chez *P. malariae*, les accès de reviviscence sont liés à la persistance d'une parasitémie résiduelle

indécelable sur frottis sanguin et goutte épaisse. Lors d'un affaiblissement de l'immunité, cette parasitémie sera exacerbée.

Le mérozoïte de provenance tissulaire pénètre dans l'hématie par endocytose pour initier la phase endoérythrocytaire et s'y transforme en trophozoïte jeune. Ce dernier grossit, son noyau se divise pour donner un schizonte chargé de pigment malarique ou hémozoïne. Chaque noyau va s'entourer d'une plage cytoplasmique donnant ainsi naissance à un schizonte mûr ou corps en rosace.

A ce stade, l'hématie fragilisée éclate pour libérer des mérozoïtes et de l'hémozoïne. Ces mérozoïtes vont parasiter des hématies vierges.

Cet accès fébrile est de type tierce (toutes les 48 heures) pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* ou de type quarte (toutes les 72 heures) pour *P. malariae*.

Pour *P. knowlesi* l'éclatement des corps en rosace intervient toutes les 24 heures (Cox-Singh et al., 2008). Théoriquement, la périodicité du cycle érythrocytaire devrait déterminer la présentation cyclique classique des symptômes tous les 2 jours dans la fièvre tierce et tous les 3 jours dans la fièvre quarte. Toutefois, en pratique, cette périodicité typique ne peut être reconnue au début de la maladie puisque la plupart des populations parasitaires sont hétérogènes avec pour conséquence l'existence de cycles schizogoniques asynchrones.

Après plusieurs cycles schizogoniques, certains mérozoïtes se différencient en éléments à potentiel sexué, les gamétocytes mâles et femelles qui sont les seules formes plasmodiales intraérythrocytaires capables de poursuivre leur évolution chez le moustique vecteur.

Il convient de noter que le *Plasmodium* est haploïde pendant la totalité de son cycle chez l'Homme.

I.2.3.2. Chez l'anophèle femelle

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

Dans l'hypothèse où le moustique a ingéré du sang contenant des gamécytes d'un seul clone, il y a autofécondation entre gamètes génétiquement identiques, avec production de zygotes homozygotes pour tous les loci en l'absence de recombinaison. Si des gamécytes de plusieurs clones sont absorbés, des croisements hétérozygotes peuvent survenir, première source de polymorphisme. La reproduction sexuée assure donc un brassage génétique important : constitution de nouveaux individus (génotypes), génération de nouvelles associations chromosomiques (« crossing over » et création de nouveaux allèles par recombinaison intragénique).

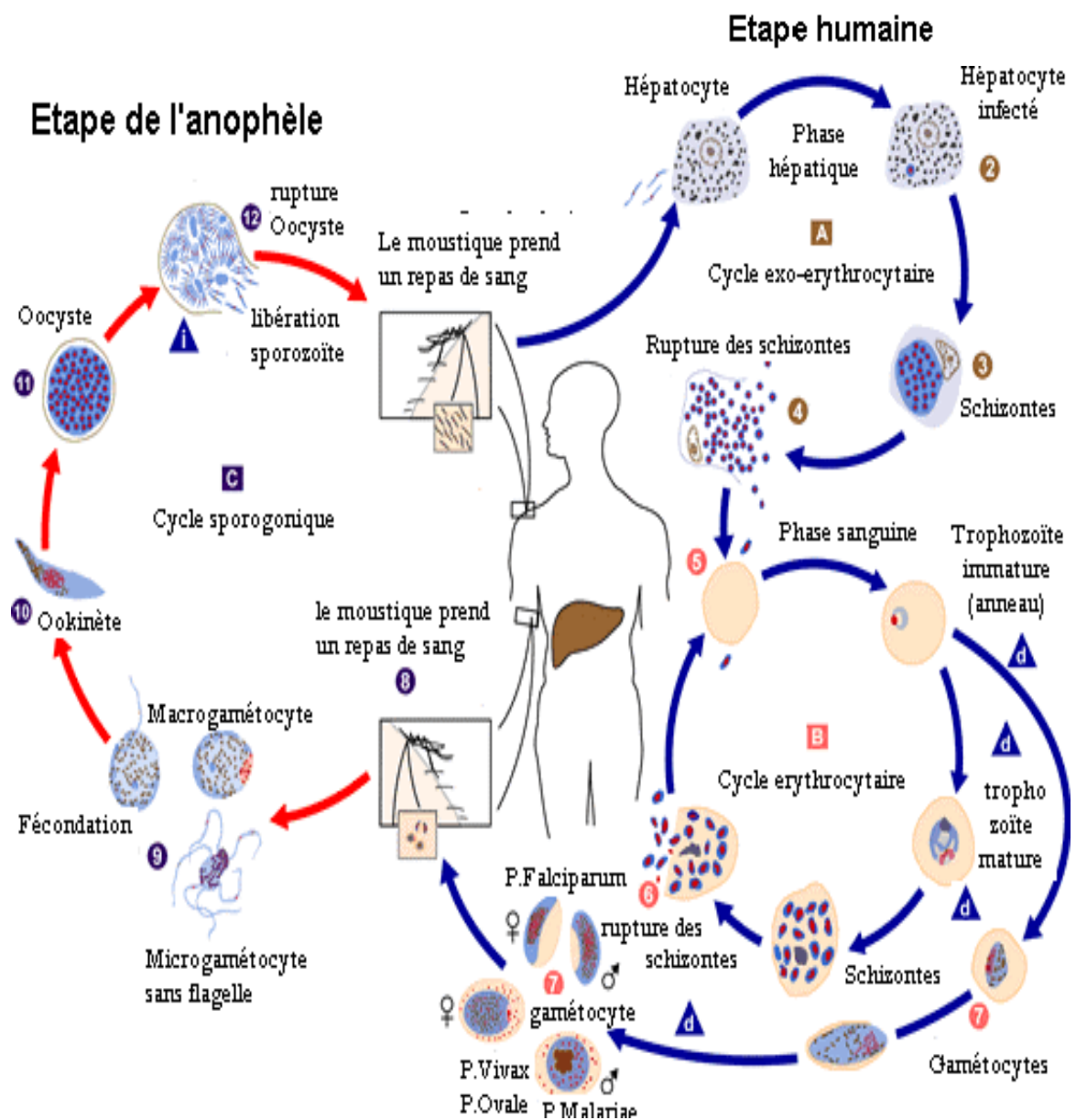


Figure 2 : Cycle évolutif de *Plasmodium*.

Source: http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/ImageLibrary/malaria_LifeCycle.GIF;

consulté le 2 octobre 2010

II. PALUDISME ET GROSSESSE

Les premiers travaux sur les manifestations cliniques du paludisme chez la femme enceinte ont été effectués au cours d'épidémies ou de cas sporadiques (Clark, 1915 ; Wickramasuriya, 1935 ; Torpin, 1941). Les résultats de ces études avaient mis en évidence l'avortement ou la naissance d'un enfant mort-né et l'accès pernicieux mortel pour la mère.

II.1. Epidémiologie du paludisme chez la femme enceinte

L'infection palustre pendant la grossesse est un problème de santé publique majeur survenant dans toutes les régions tropicales et subtropicales. Dans la plupart des zones d'endémie, les femmes enceintes représentent le principal groupe d'adultes exposés à la maladie. Le phénomène a surtout été étudié en Afrique subsaharienne qui totalise 90 % de la charge mondiale de morbidité et de mortalité liées au paludisme (Dellicour *et al.*, 2010). Pendant la grossesse, cette charge est essentiellement imputable à *Plasmodium falciparum*, qui est l'espèce la plus courante en Afrique. Les effets des trois autres parasites du paludisme humain (*P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*) sont moins évidents. En 2007, on a noté dans le monde 83,5 millions de grossesse dans les régions de paludisme à *P. falciparum* dont 54,7% dans les régions à paludisme stable et 30,6% dans les régions à paludisme instable. En Afrique, environ 30 millions de femmes enceintes vivent dans les régions impaludées dont la plupart dans des zones de transmission stable (Dellicour *et al.*, 2010).

En Côte d'Ivoire le paludisme représente 42% et 36% respectivement des causes de consultation et d'hospitalisation des femmes enceintes (Anonyme, 2008).

Les symptômes et les complications du paludisme au cours de la grossesse diffèrent selon l'intensité de la transmission et, par la suite, le taux d'immunité acquis par la femme enceinte (Desai *et al.*, 2007). Au début des années cinquante, il était admis qu'en fonction de l'endémicité, deux situations

cliniques pouvaient être distinguées : morbidité et mortalité élevées de la mère et de l'enfant en cas de paludisme instable, relative bénignité en cas de paludisme stable (Covell, 1950). Ce constat plutôt rassurant concernant les régions de forte transmission palustre, attribué à une meilleure protection individuelle, était cependant tempéré par la constatation d'une diminution du poids de naissance associée à l'infection placentaire (Bruce-Chawatt, 1952), elle-même responsable d'une morbidité et d'une mortalité accrues chez le bébé. Selon les conditions locales de transmission du paludisme, les conséquences pendant le déroulement de la grossesse sont différentes (Hamer *et al.*, 2009). D'une manière générale, l'infection plasmodiale du placenta est fréquente, en particulier en région de forte endémie palustre. Dans ce cas, les densités parasitaires dans le placenta sont généralement beaucoup plus importantes que dans le sang périphérique, et l'architecture placentaire est souvent altérée. L'anomalie histologique la plus fréquente est une inflammation intervilleuse, parfois massive, qui contribue de manière déterminante à la perturbation des échanges trophiques entre la mère et le fœtus (Duffy, 2007 ; Rogerson *et al.*, 2007).

Les femmes sont particulièrement à risque au cours de leur première et deuxième grossesse. Enfin, indépendamment de la région et de l'endémicité, le paludisme au cours de la grossesse augmente le risque d'anémie maternelle, le risque de retard de croissance intra-utérin et de prématurité, et leurs conséquences (Desai *et al.*, 2007).

En Afrique 5-10% des femmes enceintes développeraient une anémie sévère dont 26 % sont attribuées au paludisme.

Dans les régions de forte transmission, le risque de petit poids de naissance serait double chez les femmes présentant une infection palustre placentaire. En Afrique subsaharienne 20% des petits poids de naissance sont attribuables au paludisme gestationnel. On dénombre 62 000 à 363 000 décès infantiles liés au petit poids de naissance chaque année en Afrique, ce qui équivaldrait à 17

décès pour 1000 naissances vivantes. Bien qu'il existe moins de données quant au rôle de *P. vivax*, il semble qu'il puisse lui aussi provoquer une anémie et une insuffisance pondérale à la naissance (Desai *et al.*, 2007 ; Ter Kuile & Rogerson, 2008 ; Walther *et al.*, 2010).

II.2 Physiopathologie du paludisme chez la femme enceinte

Au cours de la grossesse, il se produit une immunosuppression physiologique médiée par les hormones et les protéines associées à la grossesse. Cette régulation est considérée par certains comme un ajustement nécessaire au maintien du fœtus qui est antigéniquement différent de la future mère et serait de ce fait comme un corps étranger. L'état de dépression immune générale affecte l'ensemble des mécanismes spécifiques (pour maintenir la grossesse) et non spécifiques, qui entraînent une augmentation du risque à plusieurs infections, dont le paludisme. Toutefois, quelques observations réalisées dans des régions où la transmission du paludisme est stable allaient à l'encontre de cette idée répandue de la perte pendant la grossesse, de l'immunité préalablement acquise par la femme (Rogerson *et al.*, 2007). De plus, une immunodépression généralisée ne peut pas expliquer l'influence de la parité ou de l'âge gestationnel sur la fréquence et/ou la sévérité de l'infection palustre observée au cours de la grossesse (Steketee *et al.*, 2001 ; Okoko *et al.*, 2002).

Des études conduites dans des régions endémiques pour le paludisme révèlent que les propriétés de cyto-adhérence des parasites infectant le placenta humain et les réponses immunitaires cellulaires et humorales de l'hôte expliqueraient, dans une certaine mesure, les caractéristiques épidémiologiques frappantes observées dans le paludisme maternel (Hviid, 2006 ; Rogerson *et al.*, 2007).

En effet, la mise en évidence de l'adhérence d'hématies infectées au placenta a permis de mieux comprendre les phénomènes en cause. En effet, la physiopathologie du paludisme chez la femme enceinte se distingue des autres formes de paludisme par la cytoadhérence des érythrocytes infectés à la couche du syncytiotrophoblaste du placenta (couche de tissu fœtal en contact avec la circulation maternelle), ce qui conduit à une séquestration importante des parasites dans le placenta. Cette cytoadhérence est attribuée à la capacité des hématies parasitées par des souches plasmodiales de femmes enceintes, à adhérer à un récepteur placentaire, la Chondroïtine Sulfate A ou CSA

(Rogerson, 2003; Crocker *et al.*, 2004, Rogerson *et al.*, 2007 ; Sander *et al.*, 2009). Les parasites placentaires possèdent un phénotype d'adhésion particulier qui les différencie des parasites obtenus chez les enfants, les hommes ou les femmes non enceintes. Les parasites placentaires adhèrent préférentiellement à la CSA, alors que les parasites issus de femmes non enceintes présentent rarement ce phénotype. Ces derniers adhèrent classiquement à différents récepteurs, notamment le CD36 et l'ICAM-1 (*Intercellular Cell Adhesion Molecule-1*), de l'hôte humain (Rogerson, 2003). Les parasites capables d'infecter le placenta constituent une fraction de la population parasitaire se distinguant par des propriétés génétiques, antigéniques et phénotypiques spécifiques (Rowe & Kyes, 2004 ; Gnidehou *et al.*, 2010 ; Hommel *et al.*, 2010). Les ligands parasitaires des récepteurs CD36, ICAM-1 et CSA sont exprimés par la famille des gènes var, qui code pour l'antigène PfEMP-1 (*Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein-1*). Cependant, il n'est pas encore formellement prouvé que PfEMP-1 soit le seul ligand de CSA, ni que CSA soit le seul récepteur placentaire à l'origine de la séquestration des parasites. Le répertoire génétique de chaque parasite comprend une soixantaine de gènes var, dont un seul est exprimé à la fois (Cot *et al.*, 2003, Rogerson *et al.*, 2007) codant pour un ligand PfEMP-1 particulier à la surface de l'érythrocyte infecté. Au cycle érythrocytaire suivant, le gène exprimé peut éventuellement commuter ou « switcher » de manière à coder pour un antigène PfEMP-1 différent (Gnidehou *et al.*, 2010). La principale hypothèse concernant la physiopathologie du paludisme associée à la grossesse est que, jusqu'à l'apparition d'un placenta, les parasites dont la protéine PfEMP-1 est capable de lier la CSA sont incapables de lier tout autre récepteur, et que les parasites présentant ce phénotype ne constituent jamais une population prépondérante chez les autres individus (Hviid, 2006 ; Sander *et al.*, 2009). Les Primipares ne possèdent donc aucune immunité spécifique de souche contre ces parasites adhérents à la CSA et sont sensibles à la maladie, liés à la multiplication de ces

variants (Hviid, 2006). Il a été montré que des anticorps de multipares bloquent l'adhésion des parasites placentaires à la CSA. Ces parasites possèdent un phénotype sérologique unique, et ne réagissent pas avec des anticorps d'hommes adultes de zone d'endémie. De plus les anticorps dirigés contre les parasites placentaires ne sont observés que dans le sérum de femmes vivant en zone d'endémie palustre et ayant eu des enfants (Hviid, 2006 ; Desai *et al.*, 2007).

II.3. Placenta

Organe autonome et transitoire, le placenta est destiné essentiellement à nourrir et à oxygéner l'embryon puis le fœtus pendant la vie intra-utérine (Alsat & Evan-Brion, 1998). Il apparaît comme une masse de chair ayant l'apparence d'une éponge et contient de nombreux vaisseaux. Il est essentiellement constitué par les nombreux replis de la membrane entourant le fœtus et la muqueuse de l'utérus.

II.3.1. Structure du placenta

Le placenta est un organe fascinant par la complexité de son développement et la diversité de ses fonctions (métaboliques et endocrines). Il forme l'interface entre les tissus maternels et fœtaux et réalise le paradoxe immunologique que constitue la survie du fœtus dans un organisme qui lui est en partie étranger.

Son unité structurale et fonctionnelle est la villosité chorale qui est composée essentiellement de la cellule cytotrophoblastique. Cette cellule est capable *in vitro* et *in vivo*, par fusion cellulaire, de former le syncytiotrophoblaste. Cette différenciation morphologique est associée à une différenciation fonctionnelle. Dans la villosité crampon, elle est proliférative et invasive (Strickland & Richard, 1992). Par ailleurs, elle sécrète de nombreuses protéases (Lala & Hamilton, 1996).

II.3.2. Aspect macroscopique

Le placenta à terme est un disque d'environ 16 à 20 cm de diamètre et de 3 cm d'épaisseur. Il pèse approximativement 500 à 600 g, soit environ 1/6 du poids fœtal. Mais au début de la grossesse, le volume du placenta est supérieur à celui du fœtus. Il est composé d'une partie maternelle, constituée par les transformations subies par la zone d'implantation utérine. Il s'insère normalement sur les faces ou sur le fond de l'utérus. Mais le placenta inséré dans l'utérus est beaucoup plus mince, plus étalé que le placenta après son expulsion. La face fœtale est lisse, luisante. Elle est tapissée par l'amnios, que l'on peut détacher facilement du plan sous-jacent, et qui laisse apparaître par transparence les vaisseaux placentaires superficiels de gros calibre. Sur elle, s'insère le cordon ombilical, tantôt près du centre, tantôt à la périphérie, plus ou moins près du bord. La face maternelle est tomenteuse. Elle est formée de cotylédons polygonaux séparés par des sillons plus ou moins profonds et creusés par les septa ([Merger et al., 1995](#)).

II.3.3. Circulation sanguine dans le placenta

Le placenta humain est hemomonochorial. Cette particularité est propre à l'espèce humaine, aux primates supérieurs et au cobaye. Cela permet au tissu fœtal d'être en contact direct avec le sang maternel ([Kaufman & Burton, 1994](#)). Le sang artériel maternel arrive par les branches terminales des artères spiralées utérines qui s'ouvrent dans la chambre intervillieuse. Le volume total de l'espace intervillieux est voisin de 250 ml et, comme le débit utérin est de l'ordre de 600 ml par minute, on peut estimer que le sang maternel y est renouvelé toutes les 25 secondes. Il est injecté, sous pression élevée (de 70 à 80 mmHg), sous forme de jet dirigé contre la plaque choriale tournée vers le fœtus. Ce débit sanguin est intermittent et semble contrôlé par des phénomènes vasomoteurs ayant lieu à la jonction du muscle utérin et de son revêtement muqueux : toutes les artères n'injectent pas simultanément le sang dans la

chambre intervillieuse. Le sang maternel retourne ensuite vers le muscle utérin, sa pression étant tombée à 10 ou 15 mmHg, par des orifices veineux très larges (sinus veineux), avant de rejoindre la veine utérine où la pression n'est plus que de 5 mmHg. Le facteur dominant de ces échanges sanguins est la forte différence de pression entre le flux et le reflux du sang maternel qui permet d'accroître, dans les chambres intervillieuses, le temps de contact entre le sang et la membrane placentaire. Le sang fœtal arrive au placenta par les deux artères ombilicales et repart par la veine ombilicale vers le système cave inférieur de l'embryon. A la surface du placenta, sur la plaque chorale, les artères ombilicales se divisent et se répartissent dans les troncs villositaires. L'axe mésenchymateux de la villosité chorale est parcouru par de petits vaisseaux, une veine et une artère qui se ramifient en de nombreux capillaires dans les villosités terminales. La circulation sanguine est assurée par la pompe cardiaque fœtale et par les pulsations des artères autour desquelles les veines sont enroulées.

Près du terme, le volume sanguin contenu dans les vaisseaux placentaires fœtaux étant de l'ordre de 45 ml, pour un flux foeto-placentaire d'environ 300 ml par minute, on peut, comme précédemment, estimer que le sang fœtal est remplacé toutes les 8 à 10 secondes. L'espace sanguin fœtal est donc constitué d'un faible volume à renouvellement rapide, alors que l'espace sanguin maternel présente un grand volume à renouvellement lent, situation qui favorise les échanges à partir du sang maternel. La qualité de ces échanges dépend donc de la circulation fœtale, de l'intégrité de la surface syncytiotrophoblaste et, surtout, de la circulation du sang maternel dans la chambre intervillieuse ([Alsat & Evan-Brion, 1998](#)).

II.3.4. Fonctions placentaires

Le placenta exerce de nombreuses fonctions essentielles au bon déroulement de la grossesse et à la croissance intra-utérine du fœtus. Selon [Alsat & Evan-Brion](#)

(1998), les fonctions placentaires se résument à des fonctions d'échanges, métaboliques et endocrines.

II.3.4.1. Fonctions d'échanges

Le premier rôle du placenta est de permettre les échanges entre la mère et le fœtus. Pour ce dernier, le placenta joue le rôle habituellement dévolu au rein, au poumon et à l'intestin. Le placenta a longtemps été considéré comme une membrane semi-perméable avec comme caractéristique : libre passage de l'eau, des électrolytes, des molécules de faible poids moléculaire et blocage des composés de poids moléculaire élevé. Mais, en réalité, les échanges placentaires sont beaucoup plus complexes. Certains transferts se réalisent de manière passive par simple diffusion du milieu à forte concentration vers le milieu à faible concentration, jusqu'à l'état d'équilibre. C'est le mode de passage de l'eau, de l'urée, de l'oxygène et du gaz carbonique. Il faut cependant, souligner que le transfert de l'oxygène, bien que passif au niveau de la membrane placentaire, est facilité par une plus grande affinité de l'hémoglobine fœtale pour l'oxygène que de l'hémoglobine maternelle. Le transport facilité est accéléré par une molécule porteuse, qui après couplage au flux d'un ion, se charge spécifiquement de la substance à transporter de part et d'autre de la membrane. Ce type de transport stéréospécifique est utilisé pour le D-glucose, principale source d'énergie pour le fœtus. Le transport actif nécessite un apport d'énergie issu de l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) par une ATPase placentaire avec couplage aux flux ioniques. C'est le type de transport pour les acides aminés, le sodium, le calcium et le potassium. A l'approche du terme, les concentrations plasmatiques fœtales d'acides aminés sont plus élevées que les taux maternels.

II.3.4.2. Fonctions métaboliques

Sur le plan métabolique, le placenta est un tissu très actif. Il croît et se modifie au cours de la gestation. Pour subvenir à son propre métabolisme, le placenta capte 60% du glucose maternel qu'il transforme essentiellement en lactate en fin de grossesse. Le glucose peut aussi être stocké dans le trophoblaste sous forme de glycogène. Le placenta possède l'équipement enzymatique nécessaire à la synthèse des acides gras, à leur estérification en triglycérides ou à leur oxydation en corps cétoniques. Le cholestérol de la mère est utilisé dans la constitution des membranes placentaires et la synthèse des hormones stéroïdes car, le placenta ne synthétise pas le cholestérol. Le placenta accumule aussi les acides aminés qu'il utilise pour la synthèse protéique.

II.3.4.3. Fonctions endocrines

Le placenta humain est un organe endocrine très actif qui synthétise, entre autres, de nombreuses hormones stéroïdes et polypeptidiques. La sécrétion hormonale peut être orientée de façon spécifique dans la circulation maternelle et/ou dans la circulation fœtale. Le placenta est le siège d'une production importante d'hormones stéroïdes, principalement la progestérone et les œstrogènes (Albrecht & Pepe, 1990). Ces stéroïdes agissent essentiellement au niveau du muscle utérin où la progestérone a essentiellement une action tocolytique par le biais de récepteurs spécifiques dont la synthèse est en partie contrôlée par les œstrogènes. Le placenta effectue la synthèse de progestérone et de prégnénolone, mais, il est dépourvu du complexe enzymatique nécessaire à la conversion de la prégnénolone en sulfate de déhydro-épiandrostérone, substrat de la synthèse des œstrogènes. Cette étape est réalisée par la surrénale fœtale, d'où le concept d'unité foeto-placentaire.

Le placenta sécrète également de nombreuses hormones polypeptidiques. Il s'agit essentiellement, de l'hormone chorionique gonadotrope, de l'hormone lactogène placentaire ou hormone chorionique et de l'hormone de croissance

placentaire (Alsat *et al.*, 1997). Ces hormones, stéroïdes et polypeptidiques, jouent un rôle essentiel dans l'adaptation de l'organisme maternel et dans le maintien de la gestation, de la croissance et du développement du fœtus ou même au cours de l'accouchement (Alsat & Evan-Brion, 1998).

Au vu de sa structure complexe et de ses fonctions aussi diverses que variées, le placenta joue un rôle important durant la grossesse. Son infection par un agent pathogène comme *P. falciparum* peut aboutir à des dysfonctionnements pouvant conduire à des conséquences fâcheuses sur l'aboutissement de la grossesse. En effet, le paludisme pendant la grossesse peut se traduire par des accouchements prématurés, des retards de la croissance du fœtus, une mortalité postnatale supérieure à la normale ou encore l'anémie ou la mort de la mère (Gies *et al.*, 2009 ; Menendez *et al.*, 2010). Ces complications des infections à *P. falciparum* chez la femme enceinte sont partiellement dues à la cytoadhérence des hématies parasitées par des stades matures aux syncytiotrophoblastes placentaires (Rogerson *et al.*, 2003a ; Beeson *et al.*, 2006).

II.4. Immunité antipalustre acquise chez la femme enceinte

II.4.1. Réponses immunes à l'infection placentaire

Le placenta humain est un organe anti-inflammatoire majeur favorisant la réponse immunitaire de type Th2 par l'intermédiaire de l'Interleukine 10 (IL-10); le facteur de croissance tissulaire (TGF- β) et la production de progestérone (Kabyemela *et al.*, 2008). Les cytokines anti-inflammatoires placentaires sont libérées généralement pour inhiber l'immunité à médiation cellulaire. L'expression des cytokines de la voie Th1 est associée à un avortement spontané alors que les cytokines de type Th2 permettent le maintien de la grossesse. L'interféron gamma (IFN- γ) et le *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF- α) ont des effets cytotoxiques directs envers les organismes intracellulaires et les villosités du trophoblaste. Le paludisme stimule la

production de médiateurs pro-inflammatoires écartant ainsi l'équilibre cytokine de la réponse Th2 (Fried & Duffy, 1998 ; Simpson *et al.*, 2010). Le type d'activité inflammatoire et la chronicité de la réponse inflammatoire sont plus associés à un mauvais devenir de la grossesse que ne l'est la densité parasitaire ou le pic d'activité inflammatoire (Brabin *et al.*, 2004).

II.4.2. Anticorps anti- adhésion

Il y a une évidence croissante que les anticorps anti-adhésion procurent une protection efficace contre le paludisme placentaire (Beeson *et al.*, 2006 ; Rogerson *et al.*, 2007 ; Feng *et al.*, 2009). Les anticorps anti-adhésion contre la liaison des parasites à la CSA sont associés à une réduction de la prévalence de l'infection placentaire et aussi à une réduction de la densité parasitaire placentaire. La susceptibilité des primigravides au paludisme a été reliée à l'absence de ces anticorps chez ces femmes (IgG spécifiques de VAR2CSA). Cette réponse anticorps envers des parasites associés à la grossesse est reliée à la parité, expliquant la différence de susceptibilité observée entre les primigravides et les multigravides. La différence des niveaux d'anticorps anti-adhésion a été plus associée à une protection contre le placenta palustre que le degré d'immunité humorale dépendant de la parité (Hviid, 2006 ; Guitard *et al.*, 2008 ; Guitard *et al.*, 2010 ; Hommel *et al.*, 2010).

L'agglutination des anticorps peut être trouvée plus fréquemment chez les multigravides avec un placenta palustre, mais cette agglutination n'a pas été trouvée en association avec la protection contre l'infection (Guitard *et al.*, 2010).

Aujourd'hui le VAR2CSA est le meilleur candidat vaccin chez la femme enceinte. Cette molécule du groupe PfEMP1 est codée par un gène var qui est relativement bien conservé entre différents clones parasitaires. Cette protéine est sélectivement synthétisée par les parasites adhérents à la CSA et à localisation

placentaire qui l'expriment d'ailleurs sélectivement à la surface des érythrocytes infestés (Guitard *et al.*, 2010 ; Hviid, 2010 ; Avril *et al.*, 2011).

II.4.3. Immunité Cellulaire

En l'absence d'anticorps anti-adhésion, une intense immunité à médiation cellulaire devrait permettre de contrôler l'infection. Les cytokines pro-inflammatoires induisant une réponse de type TH1, dominant chez les primigravides en l'absence d'une adéquate réponse cytokine anti-inflammatoire de type TH2. Le déséquilibre entre les réponses TH1/TH2 résulte du mauvais pronostic de l'infection placentaire chez l'hôte enceinte non immune. Le développement d'une immunité acquise en une ou deux grossesses successives limite à la fois la séquestration des parasites et l'infiltration inflammatoire. Ce qui diminuera à la fois l'intensité et la durée des cytokines pro-inflammatoires dans le placenta.

Avec le placenta palustre, la transcription de certaines cytokines est sus régulée d'où une importante augmentation des niveaux de ces cytokines dans le placenta. Leurs niveaux, de même que leurs récepteurs solubles dépassent généralement les niveaux normaux retrouvés dans la circulation périphérique, indiquant qu'il s'agit d'un processus inflammatoire local (Jakobsen *et al.*, 1998).

III. PRINCIPALES FAMILLES D'ANTIPALUDIQUES

III.1. Famille des Lysomotropes

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

III.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 ils interagiraient avec l'hème des parasites et certaines protéines parasitaires dont une pompe à calcium ATPdépendante (Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003). Ces composés ont une action très rapide sur les stades érythrocytaires du parasite, du trophozoïte jeune au schizonte mûre et une activité gamétocytocide. Cette rapidité d'action combinée à une demi-vie très courte permet de limiter l'exposition des parasites à des doses subthérapeutiques de principe actif, ce qui devrait réduire la fréquence d'émergence de parasites résistants.

Aujourd'hui sous l'impulsion de l'OMS la presque totalité des pays d'endémie palustre ont adopté les combinaisons thérapeutiques à base des dérivés de l'artémisinine (CTA) dans les stratégies de traitement de première et de seconde ligne du paludisme simple à *P. falciparum*. L'artéméthér injectable est quant à lui préconisé dans le traitement du paludisme grave chez les enfants et les adultes.

III.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 encore, le traitement de référence des accès graves à *P. falciparum* dans le monde entier. Dans cette famille on retrouve d'autres composés majeurs notamment la méfloquine et deux molécules apparentées, l'halofantrine et la luméfantrine.

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

III.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. Un seul gamétocytocide est utilisable, une amino-8-quinoléine: la primaquine. Elle est

majoritairement indiquée pour prévenir les rechutes à *P. vivax* ou *P. ovale*, deux autres espèces plasmodiales pouvant générer des accès palustres à distance de l'accès initial du fait de l'existence de stades parasites dormants au niveau hépatique, les hypnozoïtes. La primaquine permet d'éliminer ses formes hépatiques dormantes.

Les hydroxynaphtoquinones sont représentées uniquement par l'atovaquone. C'est un analogue de l'ubiquinone présent dans les mitochondries parasites et intervenant dans les réactions d'oxydo-réduction (Hudson *et al.*, 1985, Hughes *et al.*, 1990). 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 (Davies *et al.*, 1993, Ittarat *et al.*, 1992). Par ce mécanisme, l'atovaquone présente un large spectre d'activité antiparasitaire sur les plasmodies, sur les toxoplasmes (Hudson *et al.*, 1991), sur *Pneumocystis carinii*. Sur 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 (Chiodini *et al.*, 1995, Looareesuwan *et al.*, 1996) ; d'où la nécessité d'association pour une meilleure efficacité (Chiodini *et al.*, 1995). Parmi plusieurs antipaludiques testés, le proguanil a montré *in vitro* une bonne synergie d'action et une potentialisation de l'atovaquone (Looareesuwan *et al.*, 1996). L'association se présente comme un bon antipaludique prophylactique aussi bien pour l'adulte que pour l'enfant (Faucher *et al.*, 2002) avec une certaine activité sur les schizontes intrahépatiques (Berman *et al.*, 2001). Des cas de résistance à l'association atovaquoneproguanil ont été signalés (Farnert *et al.*, 2003).

III.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 (Bourgeade & Delmont, 1998, Pukrittayakamee *et al.*, 2000). Des associations de la doxycycline et de l'azythromycine sont également proposées avec les dérivés de l'artémisinine (Noedl *et al.*, 2006). La doxycycline est aussi préconisée en chimioprophylaxie antipalustre où son efficacité est comparable à celle de la méfloquine (Ohrt *et al.*, 1997).

Cependant, en cas d'utilisation prolongée, elle pourrait agir sur le tissu épidermique, notamment sur la kératine et la mélanine (Banning & Heard, 2002), avec des risques de granulomes cutanés dus à sa phototoxicité (Lim & Triscott, 2003), et plus rarement des ulcérations oesophagiennes (Morris & Davis, 2000). 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.

III.4. Antipaludiques et grossesse

Aujourd'hui la plupart des antipaludiques sont contre indiqués chez la femme enceinte par précaution d'ailleurs plutôt que par l'existence de données avérées suggérant une toxicité embryonnaire.

Seules la chloroquine, la sulfadoxine-pyriméthamine et la quinine sont clairement indiquées chez la femme enceinte. Par contre la primaquine et les tétracyclines sont absolument contre-indiquées dans cette population.

Des essais cliniques portant sur les combinaisons thérapeutiques à base des dérivés de l'artémisinine, l'amodiaquine, la méfloquine ont été conduits chez les femmes enceintes. Ces études ont montré que ces médicaments pourraient être utilisés chez la femme enceinte en particulier au deuxième et troisième trimestre de la grossesse (WHO, 2007 ; McGready *et al.*, 2008 ; Mutabingwa *et al.*, 2009 ; Mayando *et al.*, 2010). Cependant ces études à elles seules ne suffisent pas à autoriser la prescription de ces antipaludiques surtout les dérivés de l'artémisinine chez la femme enceinte compte tenu de la taille des échantillons. En effet, il faudra de nombreuses études de pharmacovigilance avant de valider l'utilisation de ces médicaments chez la femme enceinte. En plus, des études pharmacocinétiques devraient être conduites simultanément pour adapter les posologies de ces médicaments à la femme enceinte (Dellicour *et al.*, 2008). Néanmoins l'OMS recommande les combinaisons thérapeutiques à base de dérivés de l'artémisinine dans cette population au cours des seconds et troisièmes trimestres. Pour le premier trimestre les CTA ne peuvent être administrées à la femme enceinte que si c'est le seul traitement disponible ou en cas d'échec à la quinine (WHO, 2010).

IV. CHIMIORESISTANCES

IV.1. Historique et situation actuelle

L'Organisation Mondiale de la Santé définit la pharmaco-résistance comme étant "l'aptitude d'une souche de parasite à survivre ou à se reproduire malgré l'administration et l'absorption d'un médicament employé à des doses égales ou supérieures aux doses ordinaires recommandées mais comprises dans les limites de la tolérance du sujet (WHO, 2003). 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 (Verdrager, 1986). 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 (Wellems & Plowe, 2001). 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.

En Côte d'Ivoire, le premier cas de chloroquino-résistance fut suspecté en 1986 puis confirmé en 1987 à Adzopé (Nicoulet *et al.*, 1987). Depuis, cette résistance

s'est propagée à l'ensemble du pays atteignant des niveaux intolérables (Adjetei *et al.*, 1997 ; Djaman, 2003 ; Ametchi, 2004) qui ont justifié son retrait en traitement curatif et en chimioprophylaxie chez la femme enceinte.

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. Même si la sélection a été plus lente que pour la pyriméthamine seule, des résistances sont apparues en Asie du Sud Est (Hurwitz *et al.*, 1981) pour se disséminer ensuite à l'ensemble des zones d'endémies.

Dans notre pays, les études de Djaman *et al.* (2003, 2010) ont mis en évidence une résistance élevée à la sulfadoxine - pyriméthamine justifiant son retrait dans le traitement curatif du paludisme simple en 2005.

Compte tenu de son utilisation limitée, la résistance à la méfloquine n'est massivement présente qu'en Asie du Sud Est (Fontanet *et al.*, 1993). Quelques cas de méfloquino-résistance ont été décrits au Brésil (Cerutti *et al.*, 1999).

La baisse de la quininosensibilité est connue en Afrique de l'est, en Asie du Sud-Est, au Brésil et en Amazonie (Giboda & Denis, 1988 ; Harinasuta *et al.*, 1990 ; Jelinek *et al.*, 1995 ; Palmieri *et al.*, 2004 ; Briolant *et al.*, 2011). Elle reste le plus souvent partielle et de faible niveau, et n'a pour l'instant que peu de conséquences cliniques perceptibles. Dans ces zones, des résistances à la quinine sont présentes du fait de l'existence de résistances croisées avec la méfloquine.

En Côte d'Ivoire certains auteurs ont montré au cours de leurs travaux une absence de résistance *in vitro* de *P. falciparum* à la quinine (Offianan *et al.*, 2008 ; Yavo *et al.*, 2010).

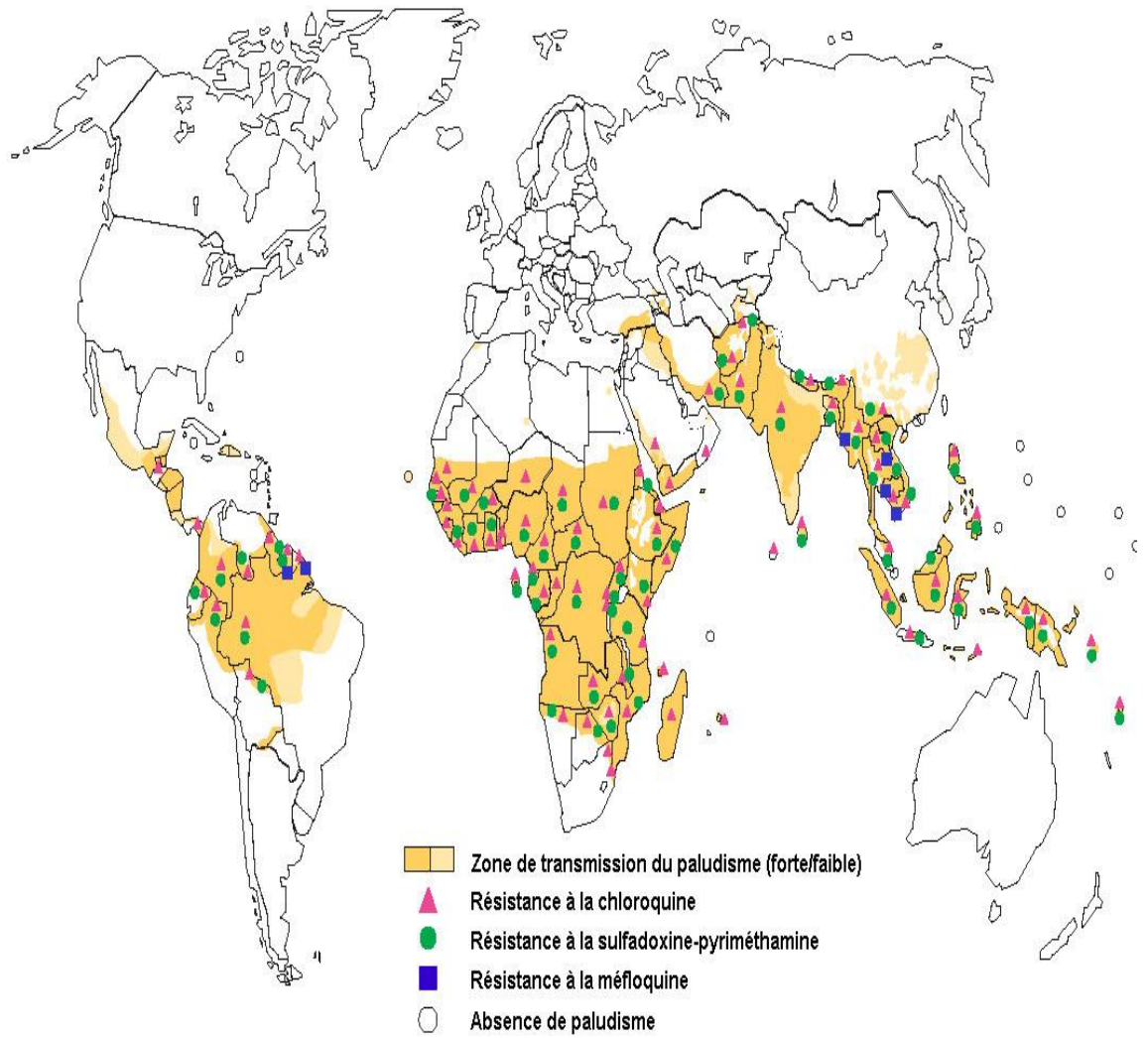


Figure 3: Situation de la résistance de *P. falciparum* aux différentes molécules utilisées en 2004 (WHO, 2005).

IV.2. Résistance aux lysosmotropes

IV.2.1. Mécanisme d'action

Les lysosmotropes (amino-alcools, amino-4-quinoléines, sesquiterpènes lactones) ont un mode d'action complexe imparfaitement connu. Ce sont des bases faibles qui se concentrent de façon sélective dans la vacuole digestive du parasite. Entre autres actions, elles bloquent la dégradation enzymatique de l'hémoglobine, source principale des acides aminés du parasite intra-érythrocytaire. La cible moléculaire serait l'hème polymérase, enzyme qui détoxifierait l'hème par la formation d'hémozoïne insoluble ou pigment malarique.

L'action des lysosmotropes concerne donc essentiellement les stades asexués dégradant l'hémoglobine : trophozoïtes âgés et schizontes immatures.

IV.2.2. Mécanisme de résistance

L'essentiel des études réalisées porte sur la chloroquine. 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).

Les premières études sur la résistance à la chloroquine ont montré qu'elle était réversible sous l'action de modulateurs des pompes membranaires comme le vérapamil et qu'elle était liée à un défaut d'accumulation de la chloroquine dans la vacuole digestive. En partant de ce constat, l'hypothèse de l'implication d'un transporteur spécifique de la chloroquine dans la vacuole a été évoquée (Bray *et al.*, 1998). Pour étudier le mécanisme de résistance à cet antipaludique majeur, un croisement de souches chloroquino-sensibles (CQS) et chloroquino-résistante (CQR) a été effectué (Su *et al.*, 1997). L'étude du génome des parasites issus de ce croisement a permis l'identification d'un gène lié à la

résistance à la chloroquine : *pfcr* (*Plasmodium falciparum* chloroquine résistance transporter). Il s'agit d'un gène de 3,1 kb situé sur le chromosome 7 de *P. falciparum*. Il possède 13 exons codant pour une protéine transmembranaire de 24 aminoacides avec un poids moléculaire de 48,6 kDa. (Jiang *et al.*, 2006). Chez les progénies de phénotype CQR, ce gène contient huit mutations ponctuelles, situées dans ou à proximité des régions transmembranaires prédites (Figure 5). Des études de transfection ont ensuite précisé l'importance de la mutation K76T du gène *pfcr* dans la résistance à la chloroquine (Fidock *et al.*, 2000). Les études épidémiologiques ont révélé la présence de plusieurs mutations supplémentaires à K76T dans le gène *pfcr*, définissant plusieurs haplotypes mutants. Leur rôle n'est actuellement pas bien défini.

Elles pourraient compenser les pertes de fitness liées à la mutation K76T ou moduleraient le niveau de chloroquino-sensibilité des parasites *in vivo* et *in vitro* (Wootton *et al.*, 2002).

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 (Sidhu *et al.*, 2002). De plus, la présence de mutations ponctuelles (N86Y principalement) au niveau du gène *pfmdr1* (*P. falciparum* multidrug résistance) module le niveau de résistance à la chloroquine, la quinine, la méfloquine, l'halofantrine et même à l'artémisinine (Somé *et al.*, 2010 ; Lekana-Douki *et al.*, 2011).

Ce gène code une glycoprotéine (Pgh1), localisée dans la membrane de la vacuole digestive, dont la protéine homologue chez l'Homme est impliquée dans l'efflux de nombreuses molécules anticancéreuses. Une amplification génique de *pfmdr1* a également été évoquée dans la résistance à la méfloquine (Lim *et al.*, 2009 ; Chavchich *et al.*, 2010 ; Alam *et al.*, 2011).

Le mécanisme de résistance aux lysosomotropes est donc complexe et fait intervenir de nombreuses mutations et parfois des amplifications de différents gènes. Cette complexité explique la sélection lente (une cinquantaine d'années) de la résistance à la chloroquine malgré son utilisation massive.

Bien qu'au plan thérapeutique, la quinine conserve encore une excellente activité schizontocide en Afrique, plusieurs auteurs ont signalé une baisse de la sensibilité *in vitro* à la quinine d'isolats prélevés chez des patients africains (Henry *et al.*, 2006, Parola *et al.*, 2007, Pradines *et al.*, 2006, Randrianarivelojosia *et al.*, 2004, Tinto *et al.*, 2006).

Des analyses génomiques ont identifié d'autres gènes codant pour des transporteurs pouvant moduler la réponse de *P. falciparum* aux antipaludiques (Anderson *et al.*, 2005, Ferdig *et al.*, 2004, Mu *et al.*, 2003). C'est le cas du gène *pfnhe-1* (*P. falciparum* sodium hydrogen exchanger 1) situé sur le chromosome 13. Il code pour une protéine, la PfNHE, impliquée dans les échanges sodium-hydrogène au niveau de *P. falciparum*. L'analyse du polymorphisme du microsatellite ms 4760 a montré une association entre le nombre de répétitions de DNNND au niveau de l'extrémité C-terminale du domaine cytoplasmique de PfNHE et la réponse *in vitro* à la quinine (Ferdig *et al.*, 2004). Une augmentation de l'activité de PfNHE entraînant une élévation du pH cytosolique a été retrouvée au niveau des souches présentant une baisse de sensibilité à la quinine (Bennett *et al.*, 2007). L'étude de la relation du polymorphisme du microsatellite ms 4760 et la baisse de sensibilité de *P. falciparum* à la quinine pourrait donc s'avérer prometteuse.

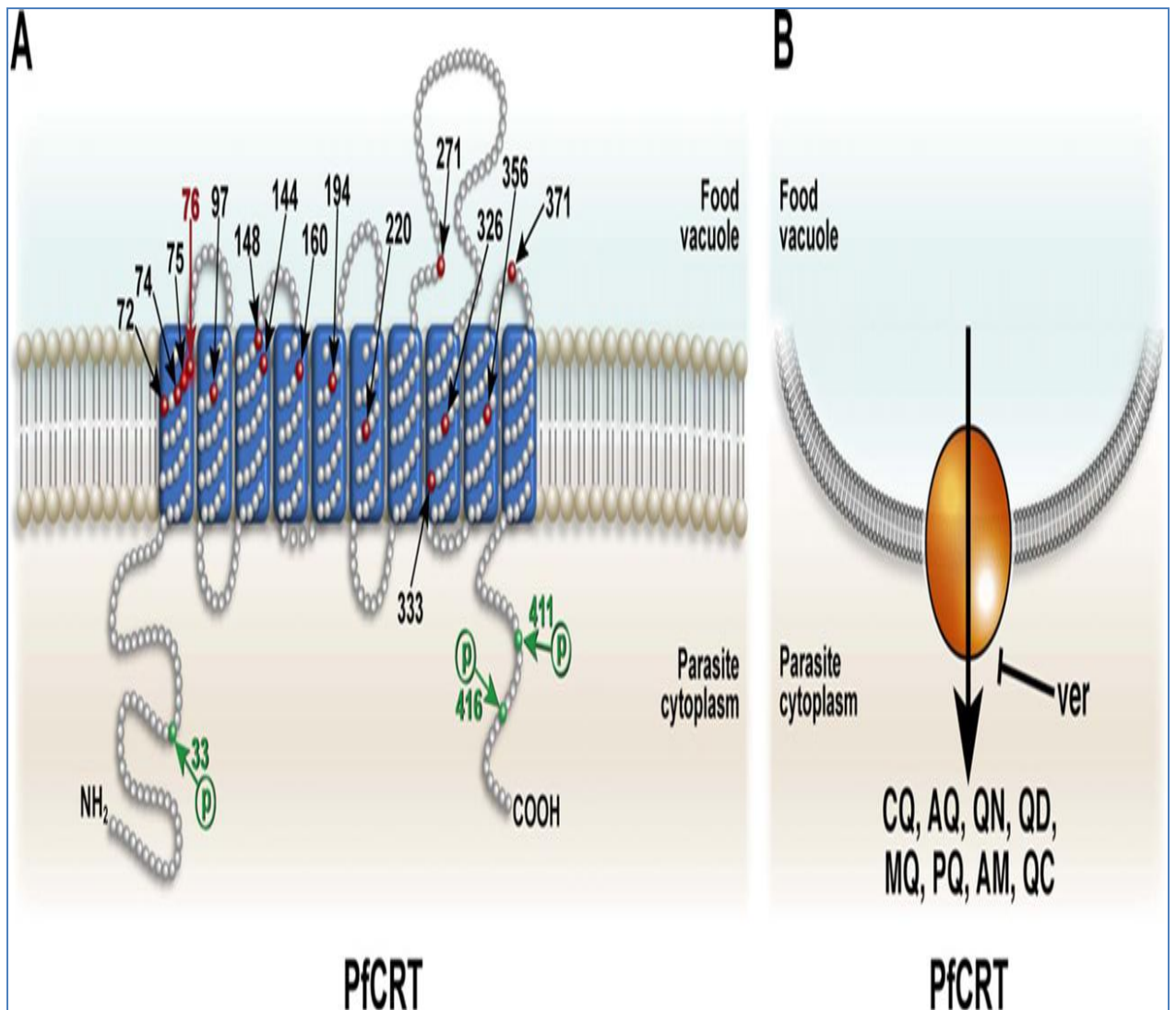


Figure 4 : Topologie et fonction de la PfCRT

A) Modèle topologique de la PfCRT. Les acides aminés polymorphes sont indiqués par les flèches noires. La substitution de la lysine (K) en thréonine (T) à la position 76, retrouvée chez les parasites chloroquinorésistants est indiquée par une flèche rouge. Les résidus qui peuvent être phosphorylés sont indiqués en vert. B) Substrats éventuels de la PfCRT. La PfCRT exporte les molécules à l'extérieur de la vacuole digestive dans laquelle elles s'accumulent. CQ, chloroquine; AQ, amodiaquine; QN, quinine; QD, quinidine; MQ, mefloquine; PQ, primaquine; AM, amantadine; QC, quinacrine. Le Verapamil (Ver) bloque l'activité de la *PfCRT* (Chinappi *et al.*, 2010; Sanchez *et al.*, 2010).

IV.3. Résistance aux antimétabolites

IV.3.1. Mécanisme d'action

L'hématozoaire ne peut utiliser qu'une très faible quantité des folates présents dans le plasma de l'hôte, si bien qu'il doit en assurer la synthèse de *novo* à partir de l'acide para-amino-benzoïque (PABA). Les antimétabolites (sulfamides et sulfones, pyriméthamine, biguanides) agissent à deux niveaux de cette synthèse. Les antifoliques (les sulfamides et les sulfones) plus concentrés dans les hématies parasitées que dans les hématies saines inhibent par compétition avec le PABA l'action de la dihydroptéroate-synthase (dhps) qui catalyse la synthèse de l'acide dihydrofolique à partir du PABA.

Les antifoliniques (les biguanides) ont pour cible une enzyme de 607 acides aminés et 71 kd, la dihydrofolate réductase (dhfr) plasmodiale ; vis à vis de laquelle ils ont une plus grande affinité que pour la DHFR de l'homme. Ils se fixent sur le site actif de l'enzyme en bloquant la synthèse des bases puriques, puis de l'ADN d'où l'arrêt de la croissance du parasite qui est totalement dépendant de cette voie pour la synthèse des pyrimidines.

IV.3.2. Mécanisme de résistance

La résistance aux antimétabolites implique des mécanismes beaucoup plus simples avec la présence de mutations ponctuelles au niveau des gènes codant les protéines cibles. Ces mutations diminuent les interactions enzyme/ligand, généralement des inhibiteurs compétitifs, en modifiant la conformation des protéines enzymatiques. Le rôle essentiel des antifoliques est de permettre une potentialisation des antifoliniques. La résistance à ces composés est due à une modification de l'enzyme DHPS (dihydroptéroate synthétase) dont le gène est situé sur le chromosome 8 et contient deux introns ([Triglia & Cowman, 1994](#)).

Ainsi, la résistance aux sulfamides est le fait des mutations ponctuelles qui surviennent dans le gène DHPS et correspond à des mutations des codons 436,

437, 581. Cette résistance augmente avec des mutations additionnelles au niveau des codons 540 et 613 (Tahar *et al.*, 2007 ; Dicko *et al.*, 2010).

Les bases moléculaires de la résistance aux antifoliques, comme la sulfadoxine-pyriméthamine, sont bien caractérisées. Chez *P. falciparum*, la résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine est essentiellement acquise à la suite de mutations ponctuelles successives au niveau du *dhfr* parasite, c'est à dire du gène codant pour la dihydrofolate réductase (*dhfr*), qui constitue l'enzyme cible particulièrement au niveau du codon 108 par remplacement de la serine par une asparagine (Enosse *et al.*, 2008 ; Malisa *et al.*, 2010). Deux ou trois mutations additionnelles qui affectent en plus du codon 108, les codons 51, 59 et rarement les codons 16 (en association avec Thr-108) et 164 élèvent le niveau de la résistance (Enosse *et al.*, 2008 ; Djaman *et al.*, 2010 ; Malisa *et al.*, 2010).

Aujourd'hui la prévalence du triple mutant *pf dhfr* (N51I, C59R, S108N) et du double mutant *pf dhps* (A437G, K540E) reste élevée en Afrique (Figures 5 et 6). La DHFR, composée de 607 acides aminés avec un poids moléculaire de 71kda est le produit d'expression d'un gène situé sur le chromosome 4 du génome plasmodial (Wu *et al.*, 1996).

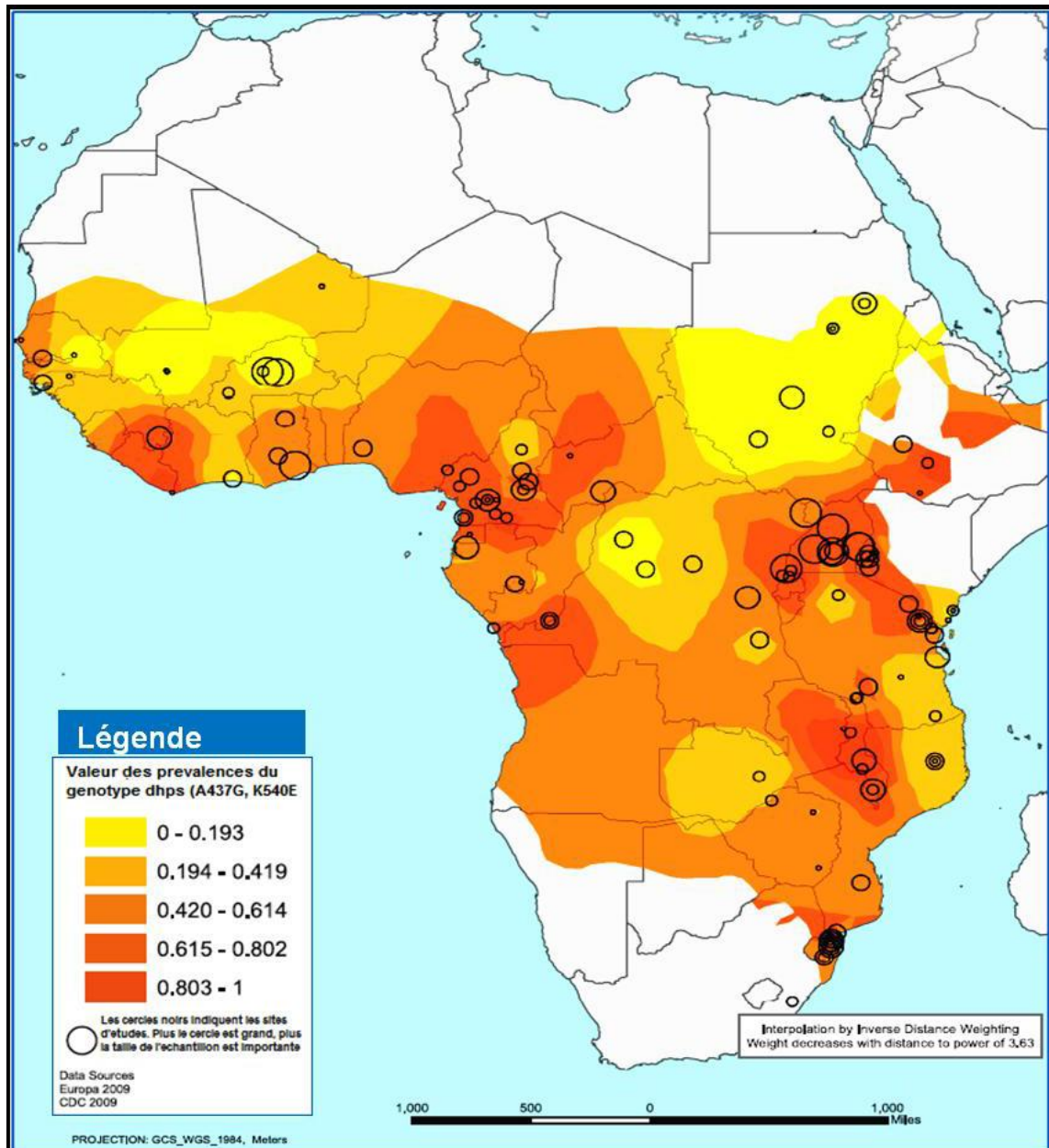


Figure 5: Prévalence du triple mutant *pfdhfr* (N51I, C59R, S108N) en Afrique (Sridaran *et al.*, 2010)

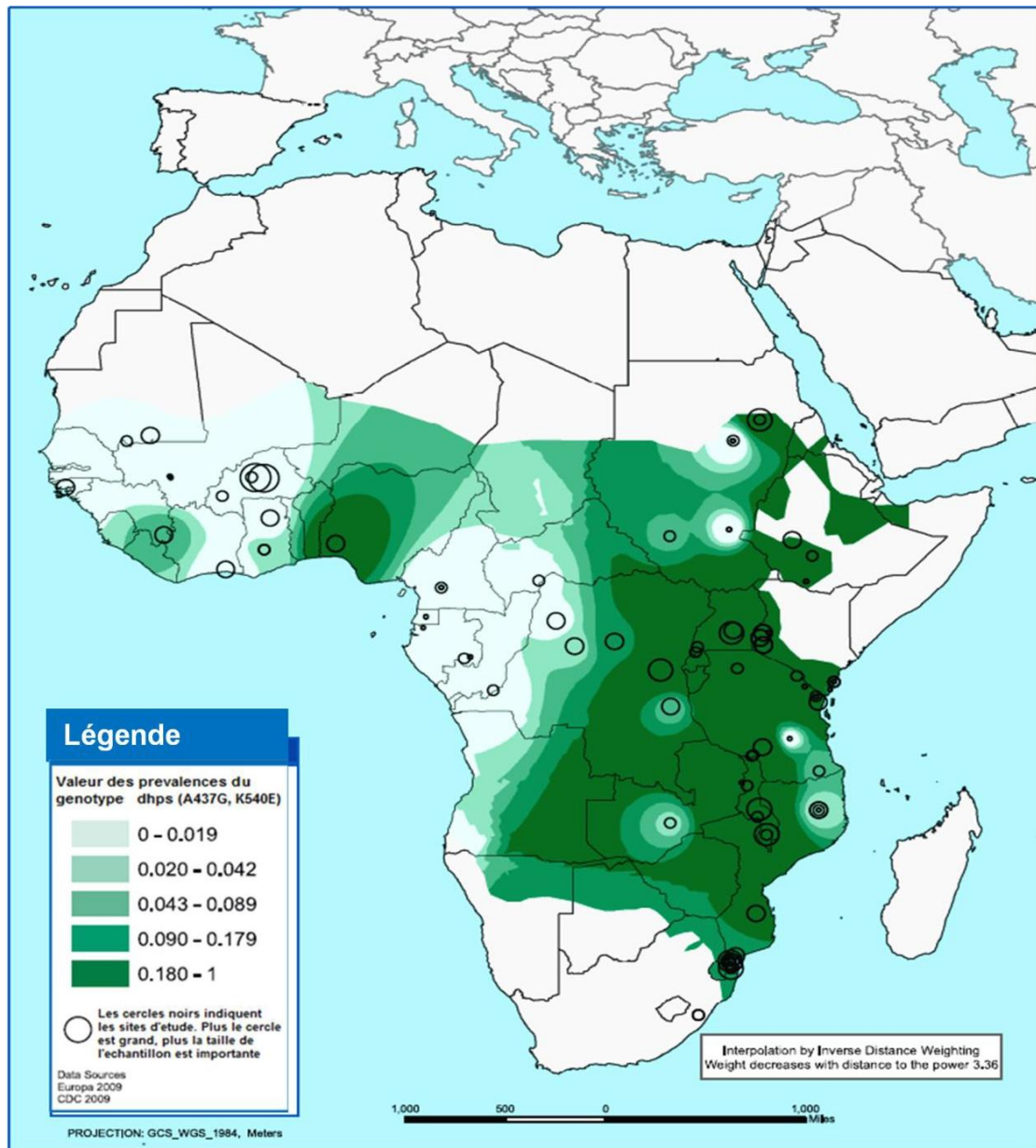


Figure 6 : Prévalence du double mutant *pf dhps* (A437G, K540E) en Afrique (Sridaran *et al.*, 2010)

IV.4. Résistance aux artémisinines

IV.4.1. Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action des artémisinines n'est pas très bien connu. Il a été proposé que l'artémisinine tue le parasite en inhibant la formation de l'hémozoïne par une activation hémo-dépendante d'un pont endoperoxyde, permettant de ce fait une accumulation de monomères d'hème toxiques (Pandey *et al.*, 1999 ; Olliaro *et al.*, 2001).

Des études *in vitro* de l'interaction entre l'artémisinine et les protéines du parasite ont conduit à la description de la protéine TCTP avec une activité de relargage de l'histamine (Mac Donald *et al.*, 2001) comme une cible potentielle du médicament. En effet Mac Donald *et al.* ont montré que dans le paludisme, la protéine TCTP a été retrouvée dans le sérum des patients présentant une importante activité de relargage de l'histamine. Mais aucune autre donnée ne confirme le rôle de cette protéine comme une cible clé du médicament.

Une Publication d'Eckstein-Ludwig *et al.* (2003) illustre une nouvelle théorie sur l'activité moléculaire des dérivés de l'artémisinine qui serait à la base de leur activité antipaludique. Leurs travaux confortent l'idée que l'activité des artémisinines ne requiert pas l'hème. Krishna *et al.* (2004) ont décrit de nombreuses protéines ATPase-Ca²⁺ chez le parasite dont l'une d'elle, la *PfATP6*, serait inhibée par l'hème. Ils ont démontré que les dérivés de l'hème inhibent de manière irréversible une enzyme membranaire du parasite, la *PfATP6* (PFA0310c, annotation dans le génome) par une mobilisation du Ca²⁺ intracellulaire. L'artémisinine exercerait son activité antipaludique en ciblant sélectivement l'activité enzymatique de *PfATP6* (Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003 ; Lim *et al.*, 2009).

IV.4.2. Mécanisme de résistance

Des cas de résistance à l'artémisinine ont été signalés dans des études *in vitro* (Jambou *et al.*, 2005) et récemment à la frontière Thaïlando-Cambodgienne au cours d'une étude *in vivo* en 2007 utilisant l'artéméther en monothérapie (Noedl *et al.*, 2008 ; Dondorp *et al.*, 2009 ; Dondorp *et al.*, 2010).

Les travaux de Dondorp *et al.* (2010) indiquent que la résistance de *Plasmodium falciparum* aux CTA se manifeste par une lente clairance parasitaire malgré la présence dans le plasma de concentrations adéquates d'artémisinine (4 mg/kg/jour pendant 7 jours). Ce temps de clairance important est associé *in vitro* à une faible CI50 aux artémisinines (Dihydroartémisinine, Artéméther, Artésunate, Arteéther). Les facteurs explicatifs de ce phénomène sont inhérents soit à l'hôte (baisse de l'immunité due à une faible transmission, les hémoglobinopathies) soit au parasite lui-même. Pour confirmer la dernière hypothèse, des travaux de génétique quantitative ont été menés sur les deux populations de parasites ; l'une de Pailin et l'autre de Wang Pha. Ces travaux ont montré que le phénotype 'longue clairance parasitaire' serait par conséquent un caractère héritable. Les gènes qui le déterminent sont en cours d'identification par associations génétiques à l'échelle du génome (Anderson *et al.*, 2010).

Les gènes suivants : *pfcg10*, *pfmdr1*, *pficpt*, *PfATPase6* sont mis en cause car intervenant dans le transport de l'artémisinine. Les mutations du gène *PfATPase6* sont également soupçonnées d'être la base génétique de cette résistance (Krishna *et al.*, 2004 ; Anderson *et al.*, 2010 ; Valderamos *et al.*, 2010).

IV.5. Dynamique des résistances

Avec l'identification des déterminants génotypiques de la résistance, de nombreuses études rétrospectives sur l'évolution de la résistance à la chloroquine et à la sulfadoxine-pyriméthamine ont été réalisées. Des marqueurs microsatellites et des mutations ponctuelles neutres se trouvant dans les régions adjacentes (autour de 5 kb) à ces déterminants de résistance ont été analysés. Les mutations ponctuelles neutres sont peu polymorphes et ont un taux de mutation faible, 10^{-9} par position et par génération (Drake *et al.*, 1998). *A contrario*, les microsatellites sont très polymorphes et évoluent plus rapidement (Ferdig & Su, 2000). L'étude des microsatellites proches de *pfcr* sur le chromosome 7 montre que parmi tous les haplotypes chloroquino-résistants qui ont émergé au fil du temps, seuls quatre ont survécu et sont encore identifiés 50 ans plus tard. Ces quatre haplotypes sont originaires de Papouasie, d'Amérique du Sud pour deux d'entre eux et d'Asie.

Certaines données suggèrent deux origines supplémentaires de la résistance à la chloroquine au Cambodge (Lim *et al.*, 2003) et aux Philippines (Chen, 2003). La résistance à la chloroquine en Afrique résulte donc de la conquête de 90% des zones impaludées par un mutant ayant émergé en Indochine dans les années 50 (Wootton *et al.*, 2002). Le mécanisme de résistance aux antimétabolites étant plus simple et l'apparition des mutations du gène *pfdhfr-ts* *in vivo* (Clyde & Shute, 1957) et *in vitro* (Paget-McNicol & Saul, 2001) ayant été rapide, l'origine de la résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine a d'abord été supposée multiple. Les études récentes ont confirmé cette hypothèse pour les simples mutants *pfdhfr-ts* (Vinayak *et al.*, 2010 ; Alam *et al.*, 2011). Cependant, concernant les parasites doubles et surtout triples mutants (*pfdhfr-ts* 108, 51, 59), le nombre d'évènements mutationnels à l'origine du haut niveau de résistance est limité c'est-à-dire inférieur à 10 (Mccollum *et al.*, 2008 ; Mita, 2010). Là encore, la résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine en Afrique

résulte d'une migration intercontinentale de parasites originaires d'Asie (Salgueiro *et al.*, 2010 ; Vinayak *et al.*, 2010 ; Alam *et al.*, 2011).

L'état actuel des connaissances montre que les émergences *de novo* des mutations de résistance qui se sont dispersées dans les zones d'endémie ont eu lieu généralement en Asie. Ces données suggèrent que les résistances émergent plus facilement dans les zones de faible transmission du paludisme du fait d'une polyclonalité et d'une immunité réduites. La polyclonalité étant limitée dans ces régions, la compétition des clones résistants avec les clones sensibles, qui ont généralement un meilleur fitness, est donc réduite tout comme les phénomènes de recombinaison à l'origine de la transmission des allèles. De plus, l'absence d'immunité entraîne un contact plus fréquent des antipaludiques avec un nombre important de parasites puisque presque toutes les infections sont symptomatiques (White, 2004). Dans les zones de forte transmission, les compétitions et les recombinaisons entre parasites sont nombreuses et les résistances disparaissent plus facilement. Il est donc important de prendre en compte le fitness des parasites résistants (Walliker *et al.*, 2005). Le fitness est défini comme la probabilité que les descendants d'une souche présentant un caractère spécial ont de survivre et de se multiplier. Dans les différents modèles utilisés pour prédire la dispersion de la résistance, une perte de 10% du fitness des parasites résistants est généralement admise. Ainsi, lors de l'arrêt de la pression médicamenteuse, la proportion de parasites sensibles augmente et les parasites résistants circulent à bas bruit (Kublin *et al.*, 2003). L'élimination du parasite dépend alors presque exclusivement de l'action du principe actif. La dynamique de la résistance est également fortement influencée par la demi-vie du principe actif et sa rapidité d'action. Les principes actifs à demi-vie longue (ex: atovaquone, méfloquine...) permettent de limiter le nombre de prises médicamenteuses, par conséquent d'améliorer l'observance, mais ont le désavantage de persister longtemps dans le sang à des doses sub-thérapeutiques. En zone de transmission, cette persistance augmente la pression

médicamenteuse sur la population parasitaire puisque des inoculations de parasites peuvent survenir durant la phase d'élimination d'un principe actif utilisé lors d'un premier accès palustre. La rapidité de dissémination des résistances à travers le monde ces dernières années ainsi que leur impact sur les populations humaines exposées imposent une surveillance attentive du niveau d'efficacité des différents antipaludiques.

IV.6. Facteurs favorisant les chimiorésistances

Le principal facteur contribuant à l'émergence et à l'expansion de la résistance est la pression médicamenteuse à cause de la forte probabilité de survie et de reproduction que confèrent les allèles mutés.

IV.6.1. Pression médicamenteuse

Les mauvaises prescriptions et compliance médicamenteuse ainsi que 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 pré-existants. 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.

La circulation des antipaludiques contrefaits ainsi que des antipaludiques mal conservés constituent des facteurs de risque de la résistance de *P. falciparum* (Newton *et al.*, 2011).

IV.6.2. Hyperparasitémie

Sans aucun traitement, les populations parasitaires peuvent se stabiliser voire décroître après plusieurs cycles endo-érythrocytaires sous l'effet combiné de l'activation des défenses immunitaires non spécifiques, de l'augmentation de la fonction splénique de clairance, de l'inhibition du développement des

schizontes par la fièvre, de la diminution de l'effectif des globules rouges fragiles. Il peut advenir cependant que le parasite échappe à ces mécanismes de contrôle pour évoluer vers une hyperparasitémie ou vers un pronostic fatal. Une hyperparasitémie mal traitée est un environnement favorable à la sélection de *novo* des parasites résistants. D'abord parce que les parasites sont présents en grand nombre, ensuite parce que les mécanismes ayant conduit à ce lourd fardeau ne sont pas réversibles pour éliminer les parasites résistants sélectionnés, enfin parce que les patients hyperparasités présentent un risque élevé de recrudescence (White *et al.*, 2009).

IV.6.3. Intensité de la transmission palustre.

En zone de forte endémicité, le niveau élevé de la transmission est maintenu en grande partie par l'immunité partielle qui protège de la prise d'antipaludiques dans les infections asymptomatiques. La survie des populations de parasites ne se trouve pas menacée puisque l'utilisation d'antipaludiques reste en deçà du seuil de sélection de résistants (Koella & Anita, 2003). Par ailleurs, la fréquence des piqûres infectantes conduit à la prise courante d'antipaludiques. Les nouvelles infections entrent alors en contact de doses sub-thérapeutiques d'antipaludiques capables de favoriser la sélection de parasites résistants dont les probabilités de survie des descendants sont néanmoins faibles. (White *et al.*, 2009). En zone de faible endémicité au contraire, l'absence d'immunité partielle exige la prise systématique d'antipaludiques en cas d'infection (Luxemburger *et al.*, 1996). La pression médicamenteuse qui s'exerce sur les populations de parasites y est plus forte, d'où la sélection de parasites résistants.

IV.6.4. Mouvements migratoires

Les migrations fréquentes déterminées par les conditions climatiques, les événements politiques ou les besoins en main d'œuvre favorisent l'introduction des souches résistantes dans une région indemne de chimiorésistance.

Ces nouvelles souches résistantes seront rapidement sélectionnées ([Tatem & Smith, 2010](#)).

IV.7. Méthodes d'étude des chimiorésistances

La surveillance de la chimiosensibilité de *P. falciparum* aux antipaludiques comporte trois approches : les tests *in vivo*, les tests *in vitro*, tout en prenant en compte les propriétés pharmacocinétiques des médicaments, et la recherche de marqueurs moléculaires.

IV.7.1. Tests *in vivo*

Ces tests ont été mis au point en 1996 et modifiés en 2001. Ils permettent d'étudier la réponse thérapeutique des antipaludiques. Actuellement, l'OMS préconise deux protocoles : un de 28 jours et l'autre de 42 jours qui tiennent compte des réponses clinique et parasitologique ([WHO, 2003](#)).

La conduite des tests *in vivo* est lourde et il est important de rappeler que de nombreux facteurs tels que le statut immunologique du patient et les interférences pharmacologiques avec les principes actifs étudiés (malabsorption, problème de métabolisation, d'élimination, interaction médicamenteuse...) rendent délicate l'estimation du niveau réel d'efficacité de la drogue considérée. Il est donc très important de pouvoir doser le principe actif (médicament administré ou son métabolite) chez les patients afin de détecter des variations de sa pharmacocinétique ou une mauvaise compliance (bien que ce facteur soit pallié par l'absorption des médicaments effectuée sous contrôle médical).

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 (MMV/WHO, 2007).

A l'issue du test, la réponse thérapeutique est classée en Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate (RCPA), Echec Thérapeutique Précoce (ETP), Echec Clinique Tardif (ECT) et Echec Parasitologique Tardif (EPT) selon des critères bien définis (WHO, 2003).

IV.7.2. Tests *in vitro*

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

Différentes études utilisant simultanément une évaluation *in vivo* et *in vitro* ont permis de démontrer la relation souvent délicate entre ces deux types de suivi de la sensibilité plasmodiale aux antipaludiques (Ringwald & Basco, 1999). La variété des tests *in vitro* réalisés souvent de façon non standardisée en l'absence de souches de références entretenues en continu au laboratoire, la multiplicité des paramètres pouvant influencer une réponse clinique, peuvent expliquer la variabilité des résultats constatés. Les techniques *in vitro* fournissent des résultats non corrélés systématiquement aux résultats *in vivo* (surtout chez des sujets immuns). En effet une résistance décelée en laboratoire pour un isolat

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

IV.7.3. Marqueurs moléculaires de résistance

Avec le développement des techniques de biologie moléculaire, de nombreuses connaissances ont été acquises ces quinze dernières années sur les mécanismes de résistance aux antipaludiques et les déterminants moléculaires associés. 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 antimétabolites qui ont généralement un mécanisme de résistance simple, les marqueurs génomiques de résistance peuvent remplacer les tests *in vitro* pour les études épidémiologiques.

*DEUXIEME PARTIE : NOS TRAVAUX
DE RECHERCHE*

*Chapitre I : Caractérisation moléculaire des gènes *pfdhfr*, *pfdhps* et *pfcr1* à Anonkouakouté, Bonoua et Samo*

Introduction

La résistance de *P. falciparum* à la plupart des antipaludiques en particulier la chloroquine (CQ) et la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) a eu pour conséquence l'augmentation de la mortalité et de la morbidité palustres (WHO, 2010).

La sulfadoxine-pyriméthamine a été préconisée en 2003 en traitement de seconde intention du paludisme simple en Côte d'Ivoire (Anonyme, 2008).

En 2005, son utilisation en traitement curatif a été abandonnée au profit des Combinaisons Thérapeutiques à base des dérivés de l'Artémisinine (CTA). La SP est exclusivement préconisée dans le TPI de la femme enceinte dans le cadre de la chimioprophylaxie depuis cette date (Anonyme, 2008).

Peu d'études d'épidémiologie moléculaire portant sur les gènes *dhfr* et *dhps*, marqueurs moléculaires de résistance à la SP ont été conduites en Côte d'Ivoire (Djaman *et al.*, 2003 ; 2010).

La Formation Sanitaire et Urbaine à Base Communautaire d'Anonkoua-kouté, l'Hôpital General de Bonoua et le Centre de Santé Rural de Samo (CSR) sont des sites d'essais cliniques de l'Unité de Paludologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire depuis de nombreuses années. L'UPAL dispose d'importantes données clinico-biologiques sur le paludisme dans ces zones. Avant nos travaux, aucune étude sur les marqueurs moléculaires *dhfr* et *dhps* n'avait été réalisée dans ces sites où les flux migratoires sont importants. Toutes ces raisons justifient le choix de ces sites pour la réalisation de cette étude.

Aujourd'hui l'analyse moléculaire constitue une excellente et rapide méthode d'évaluation du niveau de résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques en raison de la corrélation entre marqueurs moléculaires de résistance et phénotype « échec thérapeutique ». De plus l'analyse des marqueurs moléculaires permet l'étude la résistance sur plusieurs sites.

Le but de ce travail est de déterminer le niveau de résistance de *P. falciparum* à la SP dans la population par l'analyse du polymorphisme des gènes *dhfr* et *dhps* dans les trois sites d'étude où se déroulera simultanément l'étude de l'efficacité

du TPI.

Ce travail a également porté sur l'analyse du gène *crt* impliqué dans la résistance à la chloroquine afin de déterminer le niveau de résistance à cette molécule jadis utilisée en chimioprophylaxie chez la femme enceinte et officiellement retirée en 2003 dans le traitement curatif du paludisme simple.

Si les travaux montrent une réversion de la chloroquinorésistance cela voudrait dire que la molécule pourrait être utilisée à nouveau. Cette utilisation pourrait se faire en association avec un autre antipaludique dans le cadre de la chimioprophylaxie chez la femme enceinte ou du traitement curatif du paludisme simple (Chloroquine + Dérivé de l'artémisinine).

Objectif général :

Déterminer la prévalence des génotypes des gènes *pfdhfr*, *pfdhps* et *pfcr1* à Anonkoua-kouté, Bonoua et Samo.

Objectifs spécifiques :

- Déterminer la prévalence des mutations aux codons 16, 50, 51, 59, 108 et 164 du gène *pfdhfr*
- Déterminer la prévalence des mutations aux codons 436, 437, 540, 581 et 613 du gène *pfdhps*
- Déterminer la prévalence des mutations aux codons 72, 73, 74, 75 et 76 du gène *pfcr1*
- Déterminer la prévalence des triples mutants *dhfr* (IRN) et *pfcr1* (IET)

I. MATERIEL ET METHODES

I.1. Materiel

I.1.1. Type et Période d'étude

Il s'agit d'une étude prospective à visée analytique sur des populations de *P. falciparum* prélevées chez des sujets symptomatiques et asymptomatiques à Anonkoua-kouté, Samo, Bonoua. La préparation des confettis et le séquençage se sont déroulés respectivement à l'Unité de Paludologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire et au Laboratoire d'épidémiologie moléculaire de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques dans le Département des Sciences du Génome de l'Université de Washington (Seattle, USA). Les prélèvements des sujets asymptomatiques se sont déroulés de mai à juin 2008 et les confettis des sujets symptomatiques provenaient d'essais cliniques conduits de 2007 à 2008.

I.1.2. Sites d'étude

Les prélèvements des échantillons des sujets asymptomatiques ont été effectués dans les écoles primaires d'Anonkoua-kouté I, II et IV.

Les confettis des sujets symptomatiques ont été réalisés au cours des essais cliniques effectués à Anonkoua-kouté (FSUCOM), Bonoua (hôpital général) et à Samo (CSR) (Figure 7).

Ces trois sites d'étude présentent un faciès épidémiologique de type subéquatorial avec deux saisons de pluie, une longue (qui va de Mars à Juillet) et une courte (de Septembre à Novembre) et deux saisons sèches dont la plus courte s'étend d'août à septembre et la plus longue, de novembre à mars. Les précipitations excèdent 1700 mm de pluie et la température varie entre 27°C et 33°C.



Figure 7: Localisation géographique des sites d'étude

<http://www.weatherforecast.com/locations/Bonoua> .Consulté et adapté le 22 Août 2012

I.1.3. Population d'étude

La population d'étude est constituée de sujets asymptomatiques et symptomatiques.

Les élèves âgés de 6 à 12 ans, fréquentant les écoles primaires d'Anonkoua I, II et IV présentant une goutte épaisse positive et/ ou un TDR positif et ne présentant pas des signes de paludisme (fièvre, vomissements, asthénie) ont été inclus dans le groupe asymptomatique.

Tandis que dans le groupe symptomatique, le sujet devrait être âgé d'au plus 14 ans, présenter un accès palustre simple à *P. falciparum* avéré (goutte épaisse positive avec densité parasitaire comprise entre 2000 et 200 000 parasites asexués/ μ l de sang). Ces sujets symptomatiques sont recrutés au cours d'essais cliniques.

I.1.4. Matériel biologique

Le matériel biologique était constitué de confettis sanguins. La collecte de sang sur papier filtre Whatman 3MM a été réalisée soit sur le site d'étude (cas des sujets symptomatiques), soit au laboratoire de l'Unité de Paludologie (UPAL/IPCI) pour les sujets asymptomatiques. Les prélèvements de sang ont été recueillis dans des tubes EDTA avant la confection des confettis.

I.1.5. Gènes étudiés et amorces correspondantes

Trois gènes impliqués dans la résistance à la CQ et à la SP ont fait l'objet d'analyses.

❖ **Gène *pfldhfr*** [PFD0830w (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9221804>)]

Une séquence de 793 paires de base (pb) est amplifiée par PCR conventionnelle avec des amorces développées par le laboratoire d'accueil et synthétisées par InvitrogenTM. La séquence contient les points de mutations aux codons 16, 50, 51, 59, 108 et 164 qui sont les déterminants génétiques de la résistance à la pyriméthamine.

❖ Gène *pfdhps* [PF08_0095 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)]

La séquence d'intérêt est de 753 pb et a pu être amplifiée par PCR conventionnelle. Cette séquence comporte les déterminants génétiques de la résistance à la sulfadoxine aux codons 436, 437, 540, 581 et 613.

❖ Gène *pfcr* [MAL7P1.27(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)]

La séquence de ce gène comportant les déterminants génétiques de la résistance à la chloroquine vaut environ 400 pb. Elle a pu être amplifiée à partir d'un couple d'amorces de PCR conventionnelle. Les codons 72, 73, 74, 75 et 76 ont été étudiés.

Les amorces utilisées pour la Nested-PCR sont listées dans le tableau I et celles utilisées pour la réaction de séquençage dans le tableau II. Les amorces de la deuxième PCR étaient identiques à celles de la réaction de séquençage pour les gènes *pfdhfr* et *pfdhps*.

Pour le gène *pfcr*, la PCR primaire ayant permis la révélation de bandes d'ADN, nous a conduit directement à la réaction de séquençage avec le même couple d'amorces.

Toutes les amorces ont été élaborées par le Laboratoire d'épidémiologie moléculaire de la résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques dans le Département des Sciences du Génome de l'Université de Washington (Seattle, USA) et synthétisées par InvitrogenTM.

Tableau I: Amorces utilisées pour la PCR conventionnelle et pour la Nested PCR

Gène	PCR	Amorces	Séquences (5'-3')	Taille (pb)
<i>pdfhfr</i>	Primaire	S217 (Sens)	CTC CTT TTT ATG ATG GAA CAA GTC TGC GAC GTT TTC G	37
		S218 (Antisens)	TCA TAT GAC ATG TAT CTT TGT CAT CAT TCT TTA AAG GC	38
	Secondaire	S1226 (Sens)	AAC CTA AAC GTG CTG TTC AA	20
		S1227 (Antisens)	AAT TGT GTG ATT TGT CCA CAA	21
<i>pdfhps</i>	Primaire	S219 (Sens)	GTC TGC GAC GTT TTC GAT ATT TAT GCC	27
		S229 (Antisens)	GGC ATA TCA TTA TTT TTT TCT TCT CCT TTT ATA C	34
	Secondaire	S1224 (Sens)	GAT TCT TTT TCA GAT GGA GG	20
		S1225 (Antisens)	TTC CTC ATG TAA TTC ATC TGA	21
<i>Pfprt</i>	Primaire	S1236 (Sens)	GGT GGA GGT TCT TGT CTT GG	20
		S1237 (Antisens)	ATT AAA GTT GTG AGT TTC GGA TG	23

Tableau II: Amorces utilisées pour le séquençage

Gène	Amorces	Séquences (5'-3')	Taille de la séquence (pb)
<i>pdfhfr</i>	S1226 (Sens)	AAC CTA AAC GTG CTG TTC AA	20
	S1227 (Antisens)	AAT TGT GTG ATT TGT CCA CAA	21
<i>pdfhps</i>	S1224 (Sens)	GAT TCT TTT TCA GAT GGA GG	20
	S1225 (Antisens)	TTC CTC ATG TAA TTC ATC TGA	21
<i>pfert</i>	S1236 (Sens)	GGT GGA GGT TCT TGT CTT GG	20
	S1237 (Antisens)	ATT AAA GTT GTG AGT TTC GGA TG	23

I.2. Méthodes

I.2.1. Collecte de sang sur papier filtre Whatman 3MM

Les prélèvements de sang des sujets asymptomatiques effectués sur le site de l'étude ont été acheminés au laboratoire de l'UPAL/IPCI. Une fois au laboratoire, trois gouttes de sang (15µl chacune) sont déposées sur du papier filtre Whatmann 3MM (Whatman, Maidstone, United Kingdom). Le papier contenant la ou les gouttes de sang est mis à sécher pendant environ 45-60 min. Les confettis des sujets symptomatiques sont réalisés sur le site de l'étude selon la même procédure.

L'humidité étant un facteur de dégradation de l'ADN, il fallait s'assurer que les confettis étaient bien secs. Le séchage et la conservation des confettis sont des critères de contrôle de la qualité des extraits d'ADN. Chaque confetti est étiqueté et placé dans un emballage de protection contenant du gel de silicate puis conservé au laboratoire à température ambiante dans des boîtes de conservation réservées à cet effet, à l'abri de l'humidité et de la chaleur jusqu'à l'extraction de l'ADN génomique.

La quantité de sang restant du tube EDTA est centrifugée à 2000 tours/min pendant 10 min. Les différents constituants du sang total (plasma sanguin, Buffy coat et culot globulaire) sont séparés puis conservés à - 80 °C pour des études futures.

Le nombre de confettis utilisés pour l'extraction de l'ADN était de 48 et 93 provenant respectivement de sang prélevé chez les asymptomatiques et les symptomatiques d'Anonkoua-kouté. A Bonoua et Samo, l'extraction de l'ADN plasmodial a concerné 48 et 49 confettis de sujets symptomatiques respectivement.

I.2.2. Découpage des spots de papier filtre et plan de plaque

La méthode d'extraction de l'ADN génomique de *P. falciparum* utilisée a nécessité une organisation précise afin d'assurer la traçabilité des échantillons au moment de l'analyse moléculaire. Pour y arriver, la réalisation d'un plan de plaque codifié et identifié avant toute extraction est réalisée.

Chaque spot est découpé en quatre morceaux dont deux sont utilisés pour l'extraction de l'ADN plasmodial. Le découpage s'est fait à l'aide d'une paire de ciseaux et d'une pince, désinfectées à l'éthanol à 70% après chaque échantillon découpé. Le découpage s'est fait en salle d'extraction d'ADN génomique de *P. falciparum*. Les deux morceaux sont placés dans un tube Eppendorf® stérile de 1,5 ml étiqueté du code de l'échantillon découpé.

Les confettis sont ensuite transférés dans des plaques de 96 puits à l'aide de la pince préalablement désinfectée à l'éthanol 70% après chaque usage. La position de chaque échantillon dans la plaque de 96 puits est repérée et copiée dans le plan de plaque élaboré préalablement à l'aide d'un tableur Excel de Microsoft (Annexe 1).

I.2.3. Extraction de l'ADN génomique de *Plasmodium falciparum*

L'extraction est réalisée selon la procédure QIAamp® Micro kit du fabricant. C'est une méthode d'extraction à quatre étapes utilisée dans le laboratoire d'Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques. La méthode a été adaptée comme décrite ci-après.

I.2.3.1. Lyse

Les confettis découpés sont placés dans un tube Eppendorf® de 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 bloc chauffant analogue (Stuart SBH130) à 56°C pendant une heure. Au cours de cette période d'une heure le tube est vortexé pendant

quelques secondes par intervalle de 10 minutes. Le tube est ensuite sorti du bloc chauffant et centrifugé brièvement pour éliminer les gouttelettes d'eau déposées sur le couvercle du tube à la faveur de la chaleur. Un volume de 200 µl du tampon AL (Lysis buffer) dont le but est de renforcer la qualité de la lyse, est ajouté au tube dont le contenu est homogénéisé à la main par des chiquenaudes pendant quelques secondes. Le tube est ensuite placé sur un second bloc chauffant analogue (Stuart SBH130) à 70°C pendant 10 min avec homogénéisation au vortex toutes les 3 min. Cette phase se termine par une seconde brève centrifugation dans le but d'éliminer de la face interne du couvercle du tube d'Eppendorf® les gouttelettes formées par la vapeur dégagée lors du chauffage.

1.2.3.2. Adsorption aux membranes de la colonne QIAamp®

Mini Elude

Le lysat contenu dans les tubes Eppendorf® est transféré dans une colonne 'QIAamp® Mini Elude' puis centrifugé à 8000 tours/min pendant 1 min. La membrane de cette colonne est un filtre contenant des sels de Silicate dont la propriété est de retenir l'ADN génomique contenu dans le lysat. La composition du lysat et les conditions de pH y contribuent fortement. On se débarrasse alors du filtrat.

1.2.3.3. Purification

Deux tampons de lavage AW1 (Washing buffer 1) et AW2 (Washing buffer 2) sont successivement ajoutés à la colonne QIAamp® Mini Elude, au volume de 500 µl chacun. Après chaque ajout de tampon de lavage, une centrifugation à 8000 tours/min pendant 1 min est réalisée. Une dernière centrifugation est réalisée à vitesse maximale de 14000 tours/min pendant 3 min afin de s'assurer que la membrane ne contient plus aucune solution de lavage. Cette étape augmente la pureté de l'ADN en éliminant tous les contaminants résiduels. Les

sels de silicate et les conditions de pH permettent d'éviter que les protéines et autres contaminants susceptibles d'inhiber la PCR, de même que d'éventuelles réactions enzymatiques en amont ne soient retenues par la membrane.

I.2.3.4. Elution

Pour l'éluat, 40 µl de solution d'éluat (AE kit) sont ajoutés à la colonne qui est centrifugée à vitesse maximale (14 000 tours/min) pendant 1 min après incubation à température ambiante (15 à 25 °C) pendant 5 min. Ce procédé est répété une seconde fois afin de recueillir le maximum d'ADN possible.

Dans le cas de notre expérimentation, l'eau distillée est utilisée en lieu et place du tampon d'éluat AE kit. L'éluat recueilli au terme de cette opération contenait de l'ADN génomique.

I.2.4. Amplification des gènes par PCR

L'éluat ou extrait d'ADN génomique a subi une double amplification par Nested-PCR ou PCR-Nichée pour les gènes *dhfr* et *dhps*. Un mix était réalisé, puis reparti de façon équitable dans chaque tube avant d'y ajouter individuellement l'ADN de chaque isolat.

Le mix de la première PCR était composé de 7,4 µl d'eau pure ; 10 µl de PreMix A 1X (FailSafe PCR Enhancer ou stimulateur de PCR, 100mM Tris-HCl (pH 8,3, 22°C), 100 mM KCl et 400 µM de chaque dNTP, MgCl₂ (3-7 mM)); 0,4 µl d'amorces 10 mM ; 0,2 µl de la Taq FailSafe enzyme (Epicentre, Madison, WI) 0,5 U/µl auquel est ajouté 2 µl d'ADN extrait pour obtenir 20 µl de volume réactionnel. Les échantillons sont ensuite placés dans un thermocycleur pour l'amplification.

Le mix de la deuxième PCR était identique au mix de la première PCR auquel on ajoutait 2µl d'amplifiât obtenu après la première PCR.

Pour chaque gène les programmes d'amplification de la première et de la seconde PCR étaient identiques (Tableau III).

Tableau III: Programmes d'amplification

Nom du programme	Programme d'amplification primaire et secondaire	Gene
PFDHFR	<ol style="list-style-type: none">1. 94 °C x 3 min >>> dénaturation2. 94 °C x 30 sec >>> dénaturation3. 50 °C x 45 sec >>> hybridation4. 72 °C x 1 min >>> extension.5. 30 fois à partir de l'étape 26. 72 °C x 10 min >>> Extension7. 4°C >>> Infini	<i>pfdhfr</i>
PFDHPS	<ol style="list-style-type: none">1. 94 °C x 3 min>>> dénaturation2. 94 °C x 45 sec >>> dénaturation3. 51 °C x 45 sec >>> hybridation4. 60 °C x 45 sec >>> extension5. 34 fois à partir de l'étape 26. 60 °C x 5 min >>> extension7. 4°C >>> Infini	<i>pfdhps</i>
PFCRT	<ol style="list-style-type: none">1. 94 °C x 3 min >>> dénaturation2. 94 °C x 30 sec >>> dénaturation3. 56 °C x 30 sec >>> hybridation4. 62 °C x 1 min >>> extebision5. 34 fois à partir de l'étape 26. 62 °C x 5 min >>> extension7. Incubation à 15 °C x 5 min8. 4°C >>> Infini	<i>pfprt</i>

Pour le gène *pfprt*, seule la PCR primaire a été réalisée.

I.2.5. Electrophorèse classique

Une électrophorèse est réalisée de façon manuelle sans automate de migration avec un gel d'agarose pure 1% (Seaken[®] LE Agarose, Cambrex Biosciences Rockland, Inc.). Pour préparer le gel d'agarose 1%, 0,60 mg d'agarose pure est pesé dans un erlenmeyer dans lequel sont ajoutés 60 ml de tampon Tris-Borate-EDTA 1X (1 M Tris-HCl, 0.8 M acide borique, 2 mM EDTA, pH 8.0). Le contenu est homogénéisé puis l'erlenmeyer est porté au four à micro-ondes pendant 2 min. Le gel obtenu est rendu tiède à température ambiante (25°C), puis coulé délicatement dans un moule portant un peigne, de sorte à éviter la formation de bulles capables de gêner l'électrophorèse.

Une fois solidifié, le gel est débarrassé de son peigne qui libère alors des puits. Le gel contenu dans son moule est porté dans la cuve de migration contenant du tampon TBE 1X, et disposé de sorte que l'électrophorèse se fasse dans le sens de la borne négative vers la borne positive. En effet la molécule d'ADN est chargée négativement à cause des ions phosphates qui la constituent et est également disposée dans un tampon à pH > 7. Elle est donc attirée par l'anode au cours de l'électrophorèse.

Un volume de 5 µl de produit d'amplification par PCR et 1 µl de tampon de charge Gel Loading Dye Blue 6X (Bio-Labs) sont ajoutés dans chaque puits du gel d'agarose.

En dehors des produits de PCR déposés dans les puits du gel, il est également déposé dans différents puits un témoin négatif (sans ADN) composé du milieu réactionnel préalablement amplifié, un témoin positif dont l'échantillon d'ADN est connu et un marqueur de poids moléculaire SmartLadder de 10 kb (Eurogentec, CA, USA). L'ensemble est migré dans le tampon de migration à 135 volts pendant 20 minutes environ. A l'issue de l'électrophorèse, le gel d'agarose est plongé dans une solution de Bromure d'Ethidium (BET) pendant 5-10 min puis rincé avant d'être placé sur un transilluminateur disposé dans une chambre noire miniaturisé de type G:BOX BioImaging Systems (Syngene Inc.)

avec un appareil photo incorporé, une imprimante, un moniteur et une unité centrale. Des amplifiâts positifs ont été obtenus avec tous les confettis.

I.2.6. Séquençage des produits de PCR

Au total 48 amplifiâts d'isolats de sujets asymptomatiques ont été séquencés pour les gènes *pfdfhr*, *pfdhps* et *pfprt*, tandis que 93 et 65 amplifiâts d'isolats de sujets symptomatiques ont été séquencés respectivement pour les gènes *pfdfhr* et *pfdhps*, *pfprt* pour le site d'Anonkoua-kouté.

A Bonoua et Samo le nombre d'amplifiâts soumis au séquençage était de 48 et 49 respectivement pour les trois gènes. Le séquençage s'est déroulé au laboratoire d'épidémiologie moléculaire de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques du Département des Sciences du Génome de l'Université de Washington (Seattle, USA).

❖ Milieu réactionnel et programme de séquençage.

Deux milieux réactionnels, à raison d'un par amorce de PCR 2, sont préparés à partir des amplifiâts positifs. Le séquençage est par la suite réalisé dans un volume de 10 µl, avec 1,5 µl d'eau pure ; 1-3 µl de produit PCR 2; 2,7 µl de tampon de dilution 5X (400 mM de Tris-HCl et 10 mM de MgCl₂; pH 9,0) ; 0,8 µM d'amorce; et 1 µl du marqueur fluorescent Big Dye (Applied Biosystems). La réaction de séquençage s'est déroulée au thermocycleur selon le programme suivant : une incubation pour la dénaturation initiale à 96 °C pendant 10 sec ; 24 cycles avec une dénaturation à 96 °C pendant 10 sec, une hybridation à 50 °C pendant 5 sec, et une élongation à 60 °C pendant 4 min ; une dernière incubation de conservation réfrigérée à 4 °C.

❖ Réaction de précipitation à l'éthanol.

Après la réaction de séquençage, 26 µl d'éthanol 95 % sont mis dans chaque puits de la plaque PCR contenant les séquences nouvellement générées.

La plaque recouverte d'un film adhésif aluminium (Microseal) est incubée à -20 °C pendant 15 min et centrifugée à 3000 g/30 min. Après ce délai, le film adhésif est enlevé et la plaque renversée sur du papier buvard pour se débarrasser de tout l'éthanol 95 %. Maintenu dans cette position, la plaque est centrifugée à 700 g pendant 1min pour s'assurer d'avoir totalement enlevé l'alcool. Un volume de 125 µl d'éthanol 70 % est ensuite ajouté dans chaque puits de la même plaque qui est à nouveau centrifugée à nouveau à 3000 g pendant 10 min. Après avoir enlevé tout l'alcool suivant le procédé décrit plus haut, la plaque est mise à sécher à température ambiante pendant 15 à 20 min puis recouverte avec un film aluminium adhésif et conservé à -20°C jusqu'à la lecture des profils bruts ou 'base-calling' par l'automate à électrophorèse capillaires AB3100 (Applied Biosystem). De l'eau pure (26 µl) est ajoutée au préalable aux puits de la plaque avant la lecture automatique des fragments générés au thermocycleur.

1.2.7. Analyse des séquences

1.2.7.1. Détermination de la séquence par appel de bases

La lecture des profils bruts, ou base-calling (détermination de la séquence par appel de bases), s'effectue à l'aide de programmes automatiques qui lisent les bases, comparent les séquences similaires et fournissent une plate-forme intuitive de correction. Les programmes automatisés comme le programme public Phred développé à l'Université de Washington convertissent les fichiers tracés en séquences que l'on peut entrer dans une base de données juste après le séquençage. Cette information est utilisée lors des étapes ultérieures de comparaison de séquences.

1.2.7.2. Edition des contigs

L'étape de finition lors du séquençage d'un morceau d'ADN, ou contig, comprend l'alignement, le repérage et la correction des erreurs. Cette étape est

réalisée avec le logiciel d'édition de séquences Sequencher 4.1.4 (Codes Corporation, Ann Arbor, MI). Les contigs ou fragments bruts issus de l'automate, sont des séquences d'ADN assemblées en fusionnant deux séquences d'ADN ou plus. Dans le cas de notre travail, il s'agit des séquences 'brutes' correspondant aux gènes *pdfhfr*, *pdfhps*, *pfert* des isolats. Ces séquences sont corrigées à l'aide du logiciel puis analysées en parallèle.

1.2.7.3. Alignement

L'alignement consiste à aligner en parallèle deux séquences d'ADN, voire davantage, en maximisant le nombre de nucléotides ou de résidus identiques, tout en minimisant le nombre de mésappariement et de trous. Tous les contigs sont alignés y compris les séquences de référence des gènes correspondant disponibles en ligne dans de la banque de données publiques GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

1.2.7.4. Repérage

Il consiste à détecter les loci d'intérêt, à savoir les codons en position 16, 51, 59, 108, 164 du polypeptide PFDHFR (ou les bases en position 48, 153, 177, 324, 492 de la séquence nucléotidique du gène *pdfhfr*) ; les codons en position 436, 437, 540, 581 et 613 de la protéine PFDHPS (ou les nucléotides en position 1308, 13011, 1620, 1743 et 1842 du gène *pdfhps*); et les codons 72, 73, 74, 75, 76 du polypeptide PFCRT (ou les nucléotides en position 216, 219, 222, 225, 228 du gène *pfert*). L'édition de séquences des isolats est réalisée en comparant, pour un gène donné, tous les contigs en parallèle avec une séquence de référence correspondant à la souche de référence 3D7 et contenu dans la banque de données publique GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) afin d'identifier les polymorphismes uniques de nucléotides ou SNP dans les fragments de gènes séquencés.

I.2.7.5. Détermination des allèles

Le séquençage direct nous a permis de voir à partir de l'interface du logiciel d'analyse Sequencher 4.1.4, la succession des allèles correspondant à un individu. Les allèles sont attribués d'autant plus facilement qu'aucune mutation ou une mutation unique apparaissait à un locus donné (c'est le cas des mutants purs) ; ou encore lorsqu'une infection multiple apparaissait à un des loci (cas mixtes). Dans le cas où plus d'un locus présentait une infection mixte, il était difficile voire impossible de déterminer avec exactitude le génotype de l'isolat. Par ailleurs, lorsque l'électrophorégramme a présenté une infection mixte à un locus donné, les pics supplémentaires ne sont pas pris en compte dans l'analyse que si la hauteur de leurs pics respectifs était au moins égale au tiers de la hauteur du pic dominant. Les haplotypes sauvages de *pf dhfr* sont définis par As-51/Cys-59/Ser-108/Ile-164, tandis que ceux de *pf dhps* par Ser-436/Ala-437/Lys-540/Ala-581/Ala-613. Les codons mutés correspondants sont Ile-51, Arg-59, Asn ou Thr-108 et Leu-164 pour le gène *dhfr* et Ala- ou Phe-436, Gly-437, Glu-540, Gly-581 et Ser- ou Thr-613 pour le gène *dhps*.

Pour le gène *pf crt* les codons mutés et les haplotypes sauvages sont respectivement Ile-74, Glu-75, Thr-76 et Met-74/Asn-75/Lys-76.

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.

I.2.8. Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel XLSTAT[®] software, version 2010.3.08 (Addinsoft SARL, Paris, FRANCE). La comparabilité des deux groupes (asymptomatiques et symptomatiques) est effectuée par le test de

Student pour les variables continues et par le test du Chi² pour les variables discrètes avec correction de Yates en cas d'effectif inférieur à 5. Si les conditions d'application ne sont pas respectées, les comparaisons sont effectuées par le test non paramétrique de Mann Whitney ou par le test de Fisher.

Au cours de cette analyse, les intervalles de confiance à 95 % et les odds ratio sont déterminés avec un risque relatif $\alpha=0,05$. Une *p-value* inférieure à 0,05 indiquait une différence statistiquement significative.

I.2.9. Considérations éthiques et réglementaires

La présente étude a été conduite selon la Déclaration d'Helsinki et les dispositions légales et réglementaires de notre pays en la matière. Le protocole a été soumis et approuvé par la Comité National d'Ethique et de la Recherche de Côte d'Ivoire. Un consentement éclairé a été requis des parents ou des tuteurs légaux des enfants. Pour les sujets asymptomatiques, les fiches d'information et de consentement éclairé ont été remises à chaque enfant afin de les faire parvenir à leurs parents qui devaient se présenter à l'école le jour des prélèvements. L'enfant n'était prélevé qu'après signature du consentement éclairé par les parents ou tuteurs légaux.

Pour les sujets symptomatiques, le consentement avait déjà été signé par les parents ou tuteurs légaux avant la mise en route des différents essais cliniques.

II. RESULTATS

II.1. Profil génétique des isolats de *P. falciparum* à Anonkoua-kouté.

II.1.1. Résultats du séquençage

Au total, 48 fragments d'ADN d'isolats de *P. falciparum* provenant de sujets asymptomatiques ont été séquencés. Le succès du séquençage variait en fonction du gène et du locus analysés. Ainsi, pour le gène *pf dhfr*, le nombre de séquences lisibles était de 42 pour les loci N51I et C59R soit 87,5% de succès contre 44 (91,7%) pour le locus S108N. Cependant, aucune mutation n'a affecté les loci L164, T108 et V16 régulièrement impliqués dans la résistance de *P. falciparum* au cycloguanil (Tableau IV).

Le nombre de séquences lisibles obtenues pour le gène *pf dhps* était de 29 (60,4%), 30 (62,5%), 44 (91,7%) et 44 (91,7%) respectivement pour les loci A437G, S436A, A581G et A613S. La mutation G-540 était absente.

Pour le gène *pf crt*, 38 séquences lisibles contenant tous les cinq loci impliqués dans la résistance à la CQ ont été obtenues (Tableau IV).

Chez les sujets symptomatiques, 93 isolats ont été séquencés. La mutation N51I du gène *pf dhfr* était retrouvée chez 92 individus soit 98,9%, tandis que les mutations en position C59R et S108N étaient portées par 91 isolats (97,8%).

Les loci S436A, A437G, A581G et A613S du gène *pf dhps* étaient portés par 77 (82,8%), 79 (84,9%), 83 (89,2%) et 80 (86%) séquences d'isolats respectivement. Le codon 540 est resté invariant.

Au total 65 séquences du gène *pf crt* ont été observées et les points de mutation M74I, N75E et K76T étaient portés par 65, 63 et 62 isolats respectivement (Tableau IV).

La distribution des mutations pures et mixtes est indiquée dans le Tableau V.

Tableau IV : Nombre de fragments d'ADN de *P. falciparum* séquencés provenant de sujets asymptomatiques et symptomatiques

Gène	Loci	Asyptomatiques		Symptomatiques	
		Succès	Echecs	Succès	Echecs
<i>pf dhfr</i>	N51I	42 (87,5%)	6 (12,5%)	92 (98,9%)	1 (1,1%)
	C59R	42 (87,5%)	6 (12,5%)	91 (97,8%)	2 (2,2%)
	S108N/T	44 (91,7%)	4 (8,3%)	91 (97,8%)	2 (2,2%)
<i>pf dhps</i>	S436A	30 (62,5%)	18 (37,5%)	77 (82,8%)	16 (17,2%)
	A437G	29 (60,4%)	19 (39,6%)	79 (84,9%)	14 (15,1%)
	K540G	48 (100%)	0 (0%)	93 (100%)	0 (0%)
	A581G	44 (91,7%)	4 (8,3%)	83 (89,2%)	10 (10,8%)
	A613S	44 (91,7%)	4 (8,3)	80 (86%)	13 (14%)
<i>pf crt</i>	M74I	38 (79,2%)	10 (20,8%)	65 (100%)	0 (0%)
	N75E	38 (79,2%)	10 (20,8%)	63 (96,9%)	2 (3,1%)
	K76T	38 (79,2%)	10 (20,8%)	62 (95,4%)	3 (4,6%)

Tableau V : Distribution des mutations pures et mixtes des gènes *pfdhfr*, *pfdhps* et *pfcr*

Locus	Alleles	Asymptomatiques	Symptomatiques	Total	p
		Effectif (%)	Effectif (%)	Effectif (%)	
N51I	I	19/42 (45,2)	39/92 (42,4)	58/134 (43,3)	0,02
	N/I	6/42 (14,3)	7/92 (7,6)	13/134 (9,7)	0,34
C59R	R	18/44 (40,9)	46/91 (50,6)	64/135 (47,4)	0,29
	C/R	7/44 (15,9)	10/91 (11)	17/135 (12,6)	0,42
S108N/T	N	18/44 (40,9)	48/91 (52,8)	66/135 (48,9)	0,20
	S/N	7/44 (15,9)	8/91 (8,8)	15/135 (11,1)	0,25
S436A	A	4/30 (13,3)	27/77 (35,1)	31/107 (29)	0,03
	S/A	13/30 (43,3)	12/77 (15,6)	25/107 (23,4)	0,002
A437G	G	12/29 (41,4)	55/79 (69,6)	67/108 (62)	0,007
	A/G	9/29 (31)	8/79 (10,1)	17/108 (15,7)	0,01
A581G	G	0/44 (0)	1/83 (1,2)	1/127 (0,8)	1
A613S	S	0/44 (0)	2/80 (2,5)	2/124 (1,6)	0,54
	A/S	4/44 (9,1)	2/80 (2,5)	6/124 (4,8)	0,18
M74I	I	26/38 (68,4)	42/62 (67,7)	68/100 (68)	1
	M/I	9/38 (23,9)	6/65 (9,2)	15/103 (14,6)	0,04
N75E	E	26/38 (68,4)	46/63 (73)	72/101 (71,3)	0,62
	N/E	9/38 (23,7)	6/63 (9,5)	15/101 (14,9)	0,05
K76T	T	26/38 (68,4)	43/62 (69,4)	69/100 (69)	0,92
	K/T	9/38 (23,7)	9/62 (14,5)	18/100 (18)	0,25

II.1.2. Acides aminés de la DHFR, DHPS et CRT des isolats de

P. falciparum

Un effectif de 134 séquences lisibles comportait les loci N51I, C59R, et S108N sur un total de 141 échantillons, parmi lesquels 44 isolats de *P. falciparum* de sujets asymptomatiques et 89 isolats de *P. falciparum* de sujets symptomatiques. Les résultats de l'étude de la DHFR ont donné 34,6 % d'isolats *dhfr* sauvage de type A-16 / N-51 / C-59 / S-108 / I-164 (Figure 8). En plus de l'allèle sauvage, 51,1 % d'isolats *dhfr* mutant pur de combinaisons alléliques suivantes ont été obtenues : 36,8% d'isolats triples mutants I-51/R-59/N-108, 9,8% d'isolats double mutant N-51/R-59/N-108, 2,3% d'isolats doubles mutant I-51/C-59/N-108, 0,8% d'isolats double mutant I-51/R-59/S-108, 0,8% d'isolats simple mutant N-51/C-59/N-108 et 0,8% d'isolats simple mutant I-51/ C-59/S-108 (Tableau VI). Les allèles mixtes étaient portés par 14,3% des isolats dont 13 allèles portaient le triple mutant I-51/R-59/N-108 (Tableaux VI et VII). Notre étude a mis en évidence des mutations rares telles que les simples mutants Ile-51 (3,7%) et Arg-59 (2,3%) ainsi que le double mutant I-51/A-59 (2,3%).

En définitive le triple mutant I-51/R-59/N-108 a été retrouvé chez 46,6% des isolats.

Au niveau de la DHPS, très peu d'isolats *dhps* sauvage ont été mis en évidence. Ils représentaient 4,8 % des isolats et sont caractérisés par les acides aminés S-436/A-437/K-540 /A-581/A-613. Le codon 540 de tous les isolats était sauvage. Il est resté invariant. Le génotype pur était porté par 70,2 % des isolats avec des combinaisons alléliques suivantes : 12,5% d'isolats simple mutant A-436/A-437/K-540/A-581/A-613, 25% d'isolats simple mutant S-436/G-437/K-540/A-581/A-613, 29,8% d'isolats double mutant A-436/G-437/K-540/A-581/A-613, 1% d'isolats double mutant A-436/A-437/K-540/G-581/A-613, 1,9% d'isolats triple mutant A-436/G-437/K-540/A-581/S-613. Les allèles mixtes étaient retrouvés chez 25% des isolats (Figure 8, Tableau VI).

L'analyse de la CRT a montré que sur l'ensemble des séquences lisibles, 99 contenaient les trois points de mutation *pfcr* IET dont 38 chez les asymptomatiques et 61 chez les symptomatiques (Figure 8). Les résultats ont mis en évidence 12,10% d'isolats *pfcr* sauvage M-74/N-75/K-76, 69,70% de mutant pur avec 65,7% d'isolats triple mutant I-74/E-75/T-76 et 4% d'isolats double mutant M-74/E-75/ T-76 (Tableau VI).

La répartition de la fréquence des mutations des différents codons des trois gènes sont indiqués sur la figure 9.

Tableau VI : Prévalence des génotypes des gènes *pf dhfr*, *pf dhps* et *pf crt* à Anonkoua-kouté

Gène	Génotype	Asymptomatiques		Symptomatiques		Total	
		Effectif	(%)	Effectif	(%)	Effectif	(%)
<i>pf dhfr</i>	NCS	14	(31,8)	32	(36)	46	(34,6)
	<u>IRN</u>	15	(34,1)	34	(38,2)	49	(36,8)
	<u>NRN</u>	02	(4,5)	11	(12,4)	13	(9,8)
	<u>ICN</u>	03	(6,8)	00	(0,0)	03	(2,3)
	<u>IRS</u>	01	(2,3)	00	(0,0)	01	(0,8)
	<u>ICS</u>	01	(2,3)	00	(0,0)	01	(0,8)
	<u>NCN</u>	00	(0,0)	01	(1,1)	01	(0,8)
	Mixtes- <i>dhfr</i>	08	(18,2)	11	(6,7)	19	(14,3)
	Sous-Total	44	(100,0)	89	(12,4)	133	(100,0)
<i>pf dhps</i>	SAKAA	01	(3,6)	04	(4,2)	05	(4,9)
	<u>AGKAA</u>	07	(25,0)	24	(25,3)	31	(30,1)
	<u>SGKAA</u>	03	(10,7)	33	(34,7)	26	(25,2)
	<u>AAKAA</u>	05	(17,9)	08	(8,4)	13	(12,6)
	<u>AGKAS</u>	00	(0,0)	02	(2,1)	02	(1,9)
	<u>AAKGA</u>	00	(0,0)	01	(1,1)	01	(1,0)
	Mixtes- <i>dhps</i>	12	(42,9)	13	(13,7)	25	(24,3)
	Sous-Total	28	(100,0)	75	(78,9)	103	(100,0)
<i>pf crt</i>	MNK	03	(7,9)	09	(14,8)	12	(12,1)
	<u>IET</u>	26	(68,4)	39	(63,9)	65	(65,7)
	<u>MET</u>	00	(0,0)	04	(6,6)	04	(4,0)
	Mixtes- <i>Pf crt</i>	09	(23,7)	09	(14,8)	18	(18,2)
	Sous-Total	38	(100,0)	61	(100)	99	(100,0)

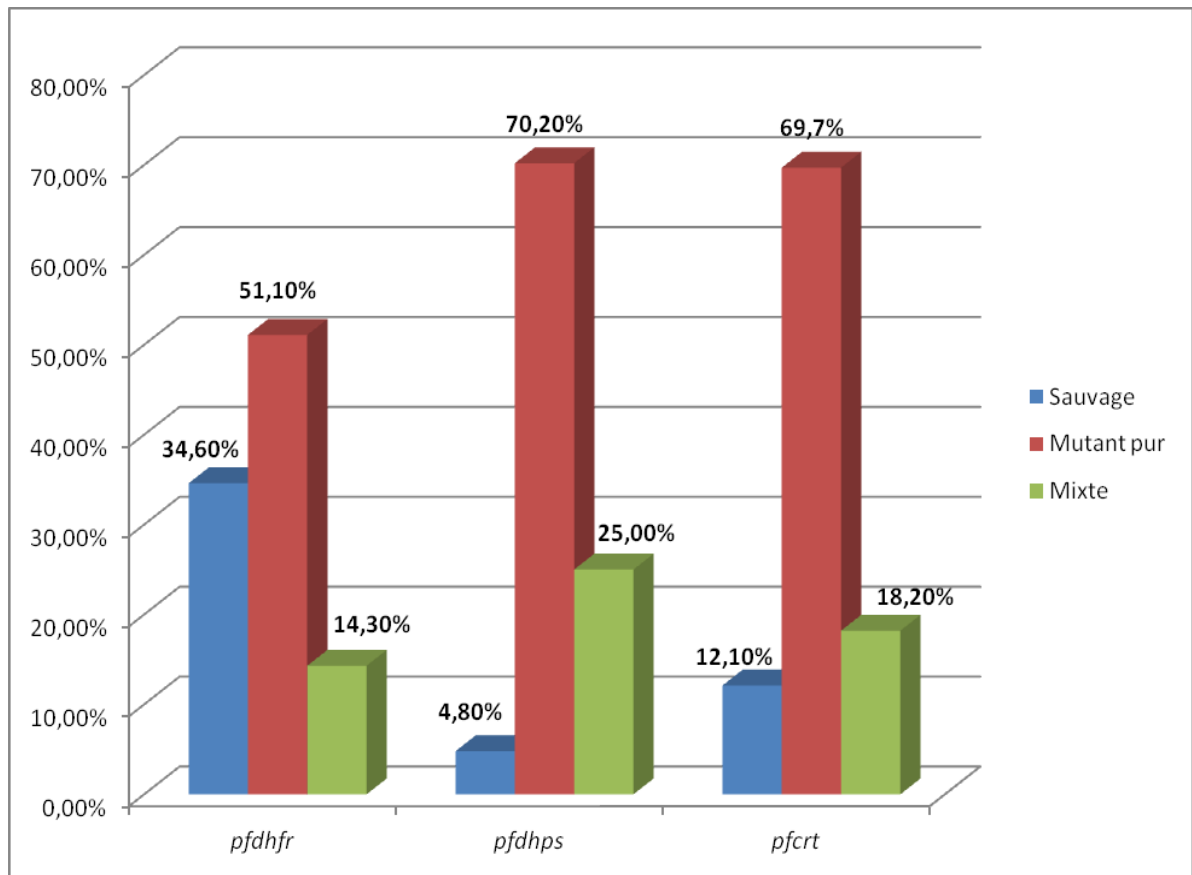


Figure 8 : Répartition des isolats selon le génotype à Anonkoua-kouté

Tableau VII : Prévalence des allèles mixtes des gènes *pfdhfr*, *pfdhps* et *pfprt*

Gène	Génotypes mixtes	Asymptomatiques	Symptomatiques	Effectif total
<i>pfdhfr</i>	<u>I</u> - <u>R</u> / <u>C</u> - <u>N</u> / <u>S</u>	1	2	3 (15,8%)
	<u>I</u> / <u>N</u> - <u>R</u> / <u>C</u> - <u>S</u>	0	2	2 (10,5%)
	<u>I</u> / <u>N</u> - <u>R</u> / <u>C</u> - <u>N</u> / <u>S</u>	5	4	9 (47,4%)
	<u>I</u> / <u>N</u> - <u>C</u> - <u>S</u>	1	0	1 (5,3%)
	<u>I</u> / <u>N</u> - <u>R</u> - <u>N</u>	0	1	1 (5,3%)
	<u>N</u> - <u>R</u> / <u>C</u> - <u>N</u> / <u>S</u>	1	2	3 (15,8%)
	Sous-Total	8	11	19 (100%)
<i>pfdhps</i>	<u>A</u> / <u>Y</u> - <u>A</u> / <u>G</u> -KAA	1	0	1 (4,2%)
	<u>A</u> / <u>Y</u> - <u>A</u> / <u>G</u> -KA- <u>A</u> / <u>S</u>	1	0	1 (8,3%)
	<u>A</u> - <u>A</u> / <u>G</u> -KAA	0	1	1 (4,2%)
	<u>S</u> / <u>A</u> - <u>A</u> / <u>G</u> -KAA	6	6	12 (50%)
	<u>S</u> / <u>A</u> -AKAA	2	2	4 (16,7%)
	<u>S</u> / <u>A</u> -AKA- <u>A</u> / <u>S</u>	0	1	1 (4,2%)
	<u>S</u> / <u>A</u> - <u>G</u> KAA	1	2	3 (12,5%)
	<u>S</u> / <u>A</u> - <u>A</u> / <u>G</u> -KA- <u>A</u> / <u>S</u>	0	1	1 (4,2%)
	<u>S</u> / <u>Y</u> - <u>A</u> / <u>G</u> -KA- <u>A</u> / <u>S</u>	1	0	1 (4,2%)
	Sous-Total	12	13	24 (100%)
<i>pfprt</i>	M/ <u>I</u> - <u>N</u> / <u>E</u> -K/ <u>T</u>	9	6	15 (83,3%)
	<u>I</u> <u>E</u> - K/ <u>T</u>	0	1	1 (5,6%)
	MN- K/ <u>T</u>	0	2	2 (11,1%)
	Sous-Total	9	9	18 (100%)

On dénombrait 8 allèles mixtes, soit 18,2 % dont 6 contenaient le triple mutant IRN chez les asymptomatiques. Dans le groupe des symptomatiques, 11 isolats soit 12,4 % portaient des allèles mixtes dont 7 contenaient le triple mutant IRN.

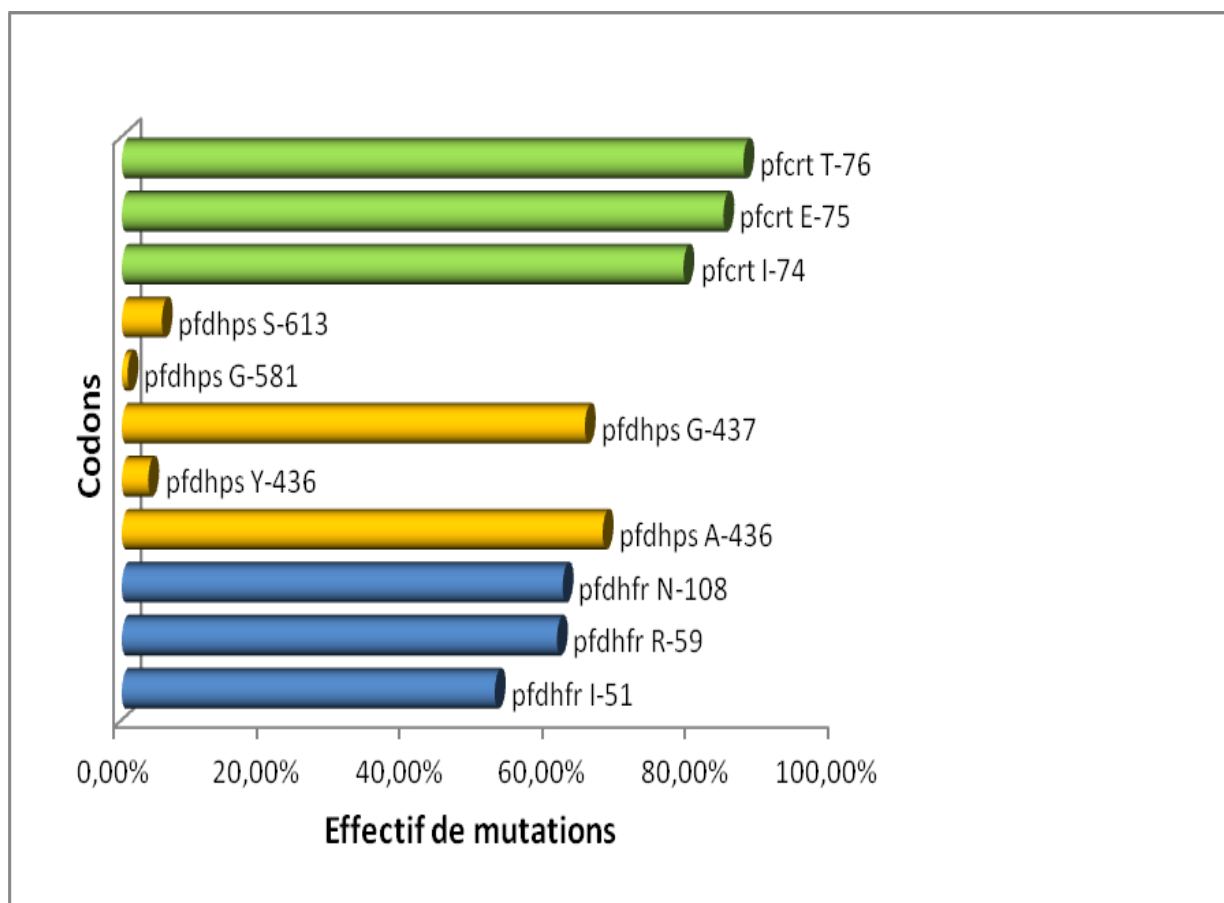


Figure 9 : Fréquence des mutations des codons des gènes *pfcr*, *pfdhps* et *pfdhfr* des isolats de *P. falciparum* à Anonkoua-kouté

L'analyse du gène *pfcr* a montré que 87/100 (87%), 85/101 (84,2%) et 81/103 (78,6%) portaient respectivement les mutations T-76, E-75 et I-74.

Les mutations A-436 et G-437 étaient retrouvées respectivement chez 72/107 (67,3%) et 70/108 (64,8%) des isolats.

Au niveau du gène *pfdhfr* 70/134 (52,20%), 81/133 (60,9%) et 82/133 (61,7%) des isolats portaient respectivement les mutations I-51, R-59 et N-108.

Tableau VIII : Allèles *pf dhfr*/*pf dhps* associés à Anonkoua-kouté

Allèles <i>pf dhfr</i> / <i>pf dhps</i>	Asymptomatiques		Symptomatiques		Total		<i>p-value</i>
	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%	
ICN-SGKAA	1	12,5	0	0	1	2,1	0,13
IRN-AAKAA	2	25	3	7,5	5	12,5	0,32
IRN-AGKAA	0	0	10	25	10	20,8	0,26
IRN-SGKAA	1	12,5	6	15	7	14,6	0,29
NCS-AAKAA	1	12,5	3	7,5	4	8,3	0,21
NCS-AAKGA	0	0	1	2,5	1	2,1	0,03
NCS-AGKAA	3	37,5	3	7,5	6	12,5	0,46
NCS-AGKAS	0	0	1	2,5	1	2,1	0,03
NCS-SAKAA	0	0	0	0,00	0	0,00	0,03
NCS-SGKAA	0	0	8	20	8	16,7	0,2
NRN-AAKAA	0	0	1	2,5	1	2,1	0,03
NRN-AGKAA	0	0	2	5	2	4,2	0,03
NRN-SAKAA	0	0	1	2,5	1	2,1	0,03
Total	8	1	40	1	48	1	1

Quatre variantes du gène *pf dhfr* et 7 variantes du gène *pf dhps* ont été observées. Sur un total de 13 combinaisons, le double mutant *pf dhps* et le triple mutant *pf dhfr* étaient prédominants. En s'intéressant aux loci d'intérêt en santé publique (*pf dhfr* N51I-C59N-S108R/*pf dhps* S436A-A437-K 540E-A581G-A613S) et aux mutants purs, les allèles quadruples mutants dans lesquels le triple mutant IRN était associé à la mutation 437G (IRN-AGKAA ; IRN-SGKAA) étaient majoritaires (17,4 %).

II.2. Profil génétique des isolats de *P. falciparum* à Bonoua et Samo.

II.2.1. Résultats du séquençage

Au total 48 et 49 échantillons ont été séquencés respectivement à Samo et Bonoua. Le gène *pf dhps* a été séquencé avec succès dans 62,5% et 83,7% des cas respectivement à Samo et Bonoua. Quant au gène *pf dhfr*, les taux respectifs de succès du séquençage étaient de 64,6% et 93,9% à Samo et Bonoua (Tableau X). Tous les échantillons ont été séquencés avec succès à Samo et Bonoua concernant le gène *pf crt*. La répartition des mutations pures et mixtes sont indiquées dans le tableau XI.

Tableau IV : Nombre de fragments d'ADN de *Plasmodium falciparum* séquencés provenant de sujets symptomatiques à Bonoua et Samo

Gène	Samo		Bonoua	
	Succès	Échecs	Succès	Échecs
<i>Pfdhps</i>	30 (62,5%)	18 (37,5%)	41 (83,7%)	8 (16,3%)
<i>Pfdhfr</i>	31 (64,6%)	17 (35,4%)	46 (93,9%)	3 (6,1%)
<i>Pfcrt</i>	48 (100%)	0 (0%)	49 (100%)	0 (0%)

Tableau X : Distribution des mutations pures et mixtes des gènes *pfdhfr*, *pfdhps* et *pfcr*

Locus	Allèles	Samo		Bonoua		p-value
		Effectif	%	Effectif	%	
N51I	I	6 /31	19,4	15/46	32,6	0,20
	N/I	16 /31	51,6	31/46	67,4	0,16
C59R	R	13 /31	41,9	23/46	50	0,49
	C/R	8 /31	25,8	1/46	2,2	0,002
S108N/T	N	14 /31	45,2	24/46	52,2	0,55
	S/N	7 /31	22,6	0/46	0,00	0,001
S436A	F	1 /30	3,3	0/41	0,00	0,42
	S	8 /30	26,7	4/41	9,8	0,11
	S/A	7 /30	23,3	13/41	31,7	0,40
	S/L	0 /30	0,00	24/41	58,5	<0,0001
A437G	Y	1 /30	3,3	0/41	0,00	0,43
	G	22 /30	73,3	41/41	9,8	0,0005
	A/G	1 /30	3,3	0/41	0,00	0,43
A581G	A	30 /30	100	42/42	100	1,00
A613S	S	3 /30	10	0/42	0,00	0,07
	A/S	2 /30	6,7	0/42	0,00	0,17
M74I	I	38 /47	80,9	48/48	100	0,001
	M/I	2 /47	4,3	0/48	0,00	0,24
N75E	E	40 /47	85,1	48/48	100	0,006
	N/E	1 /47	2,1	0/48	0,00	0,49
K76T	T	40 /42	95,2	48/48	100	0,21
	K/T	1 /42	2,4	0/48	0,00	0,47

II.2.2. Acides aminés de la DHFR, DHPS et CRT des isolats de *Plasmodium falciparum*

La variabilité génétique est très réduite à Bonoua par rapport à Samo. Le triple mutant *pfprt* I-74/E-75/T-76 était retrouvé chez tous les isolats à Bonoua (48/48) (Tableau XI, Figure 10). A Samo, il était majoritaire avec 86,36 % (38/44) avec six autres allèles rares de fréquence 2 % (1/44) dont l'allèle sauvage *pfprt* M-74/N-75/K-76. L'allèle pur *pfdhps* S-436/G-437/K-540/A-581/A-613, les allèles mixtes *pfdhps* S-436/L-437/L-540/A-581/A-613 et *pfdhps* Arg-436/Gly-437/Lys540/Ala-581/Ala-613 étaient retrouvés respectivement chez 13,33 % (4/30), 58,54 % (24/41) et 31,71 % (13/41) des isolats à Bonoua (Tableau XI, Figure 11).

A Samo, 11 allèles ont été mis en évidence dont l'allèle pur *pfdhps* S-436/G-437/K-540/A-581/A-613 chez 23,33 % (7/30) des isolats étudiés et l'allèle sauvage *pfdhps* S-436/A-437/K-540/A-581/A-613 rencontré dans 3,33 % (1/30) des cas. Les doubles mutants *pfdhps* F-436/A-437/K-540/A-581/S-613, *pfdhps* Y-436/A-437/K-540/A-581/S-613 et *pfdhps* A-436/G-437/K-540/A-581/S-613 étaient rares (3,33%, 1/30) (Figure 11). La différence des distributions des proportions alléliques entre Samo et Bonoua était très hautement significative ($p < 0,0001$).

Tableau XI : Prévalence des génotypes des gènes *pfprt*, *pfhfr* et *pfhps* à Samo et Bonoua

Gène	Génotype	Bonoua		Samo		p-value		
		n	(%)	n	(%)			
<i>pfprt</i>	Pur	CVIET	48	100	38	86,4	0,004	
		CVMET	0	0	1	2,3		
		CVMNK	0	0	1	2,3		
	Mixte	CV-M/I-N/E-T	0	0	1	2,3		
		CV-M/I-N/E-T/K	0	0	1	2,3		
		CVME-T/K	0	0	1	2,3		
		CV-M/N-E-T/K	0	0	1	2,3		
	Total	48	100	44	100			
<i>pfhfr</i>	Pur	NCSI	23	50	12	38,7		
		IRNI	15	32,6	6	19,4		
		NRNI	7	15,2	3	9,7		
	Mixte	N/I-C/R-S/N-I	0	0	6	19,4		
		N/I-C/R-SI	0	0	1	3,2		
		N/I-CSI	0	0	1	3,2		
		N/I-RNI	0	0	1	3,2		
		N-C/R-S/N-I	0	0	1	3,2		
		N-C/R-SI	1	2,2	0	0		
		Total	46	100	31	100		
<i>pfhps</i>	Pur	AGKAA	0	0	8	26,7	<0,0001	
		SGKAA	4	9,8	7	23,3		
		AAKAA	0	0	3	10		
		AGKAS	0	0	1	3,3		
		FAKAS	0	0	1	3,3		
		SAKAA	0	0	1	3,3		
		YAKAS	0	0	1	3,3		
		Mixte	S/A-GKAA	13	31,7	4		13,3
	S/A-GKA-A/S		0	0	2	6,7		
	<u>A</u> -G/A-KAA		0	0	1	3,3		
	S/ <u>A</u> - <u>G</u> /A-KAA		0	0	1	3,3		
	S/ <u>L</u> - <u>G</u> KAA		24	58,5	0	0		<0,0001
	Total	41	100	30	100			

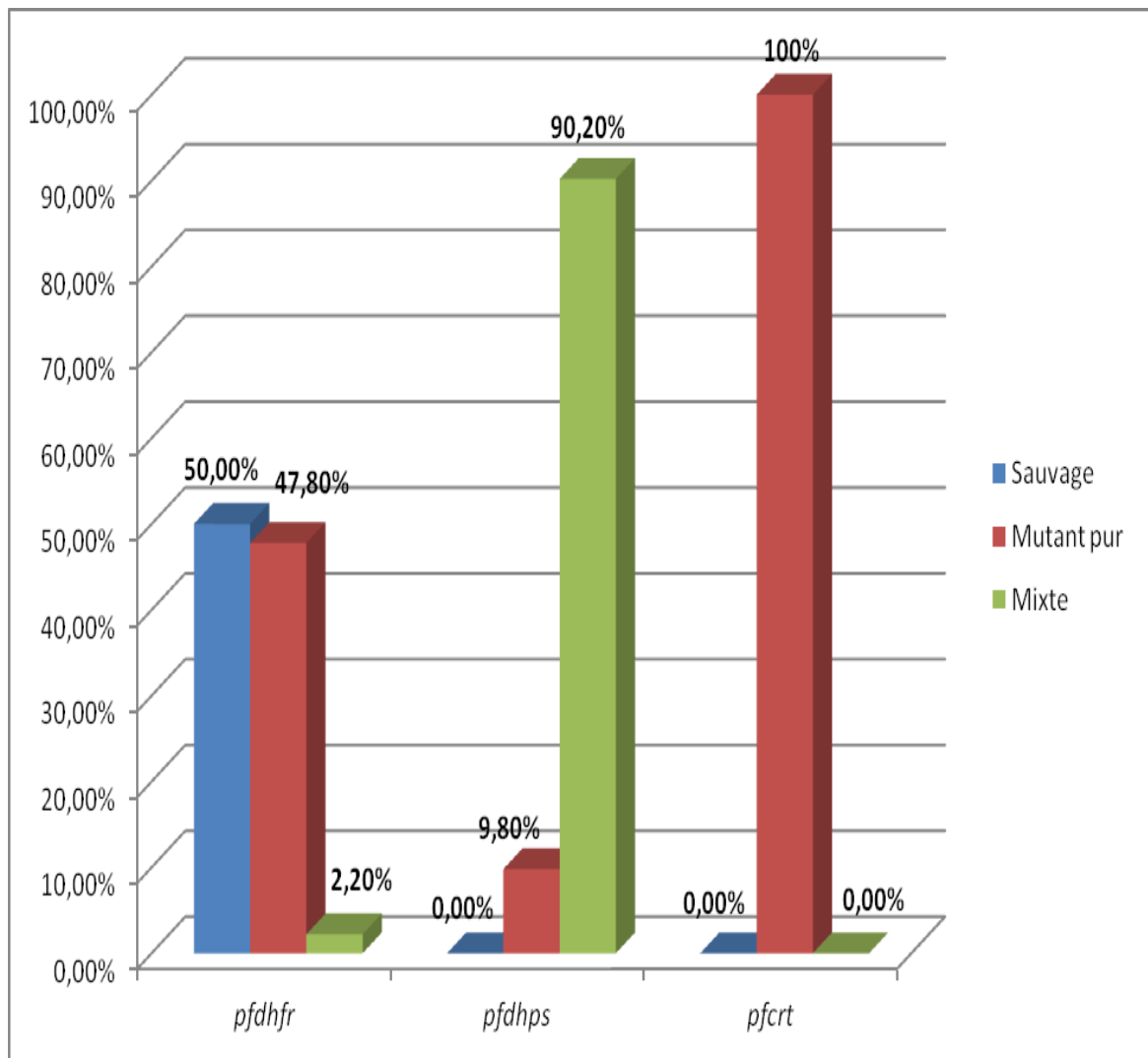


Figure 10 : Répartition des isolats selon le génotype à Bonoua

Tous les isolats de *P. falciparum* portaient le génotype mutant pur pour le gène *pfcr1*. Le génotype mixte était majoritaire pour le gène *pfdhps* car il était porté par 90,20% des isolats. La moitié des isolats portait le génotype sauvage pour le gène *pfdhfr*.

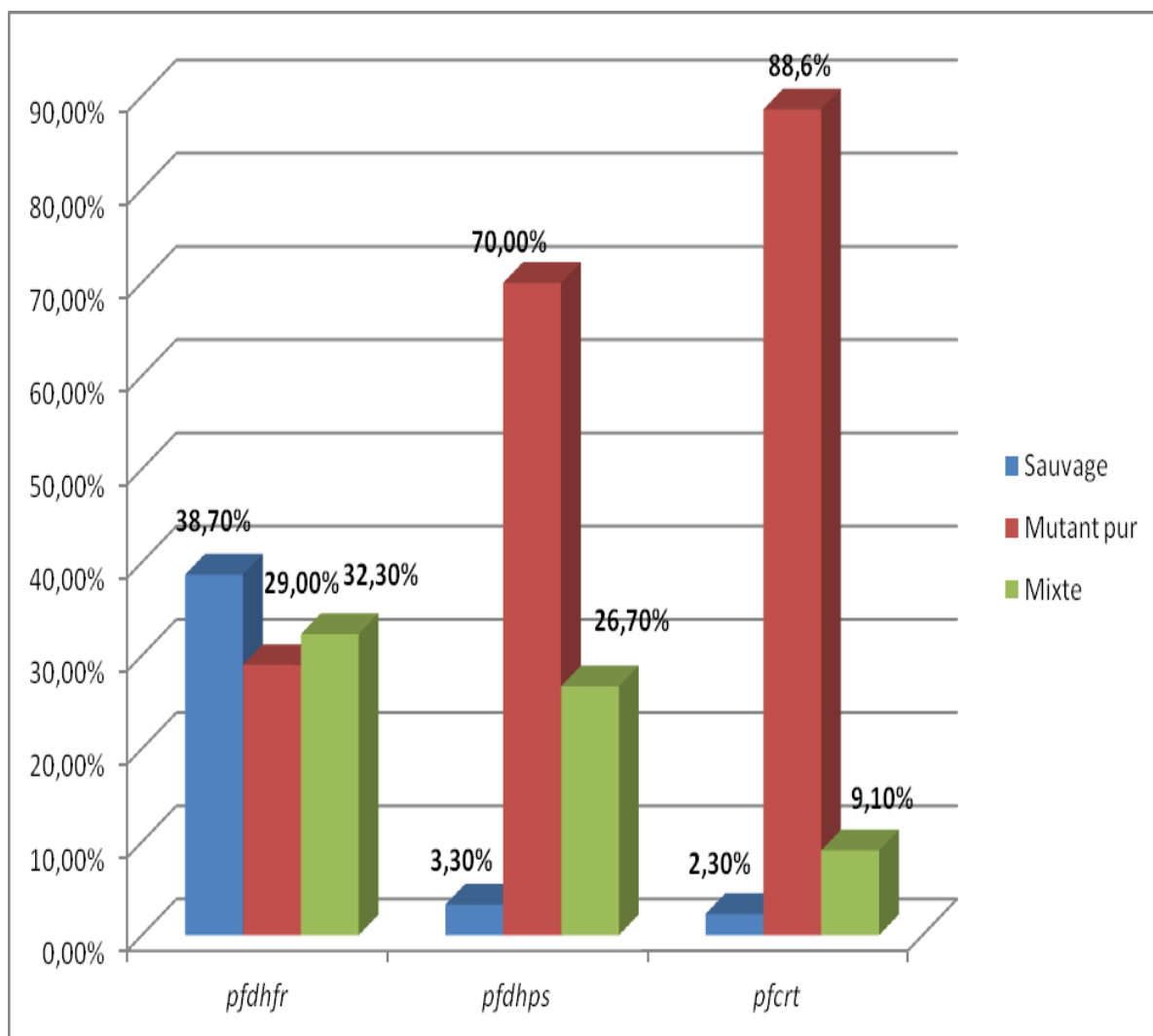


Figure 11 : Répartition des isolats selon le génotype à Samo

Le génotype mutant pur était majoritaire pour les gènes *pfdhps* (70%) et *pfcr1* (88,60). Pour le gène *pfdhfr*, 38,70% des isolats portaient le mutant pur.

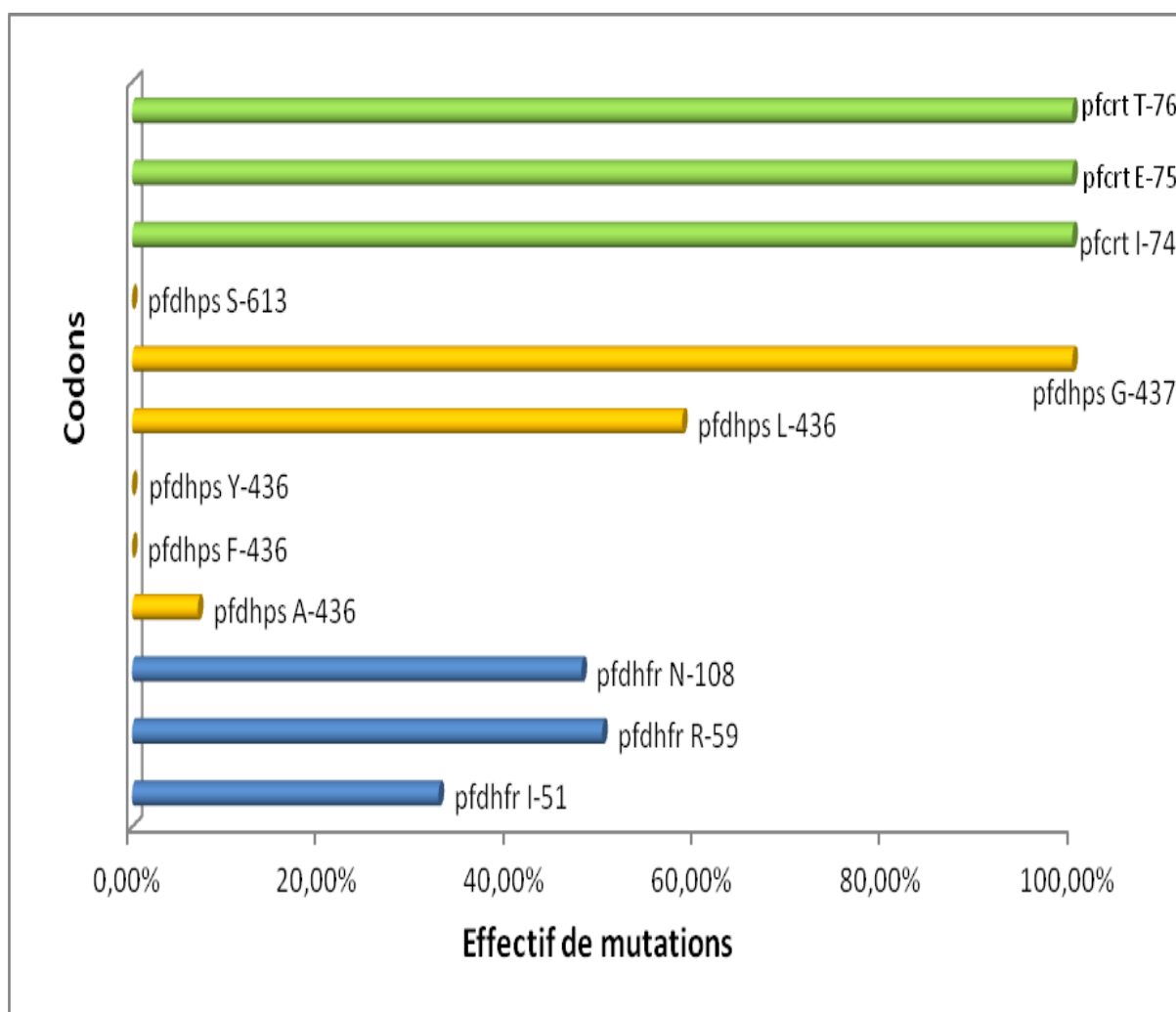


Figure 12 : Fréquence des mutations des codons des gènes *pfdhfr*, *pfdhps* et *pfcr1* des isolats de *P. falciparum* à Bonoua

Les mutations T-76, E-75 et I-74 du gène *pfcr1* étaient retrouvées chez tous les isolats de *P. falciparum* de Bonoua ainsi que la mutation G-437 du gène *pfdhps*. La mutation mixte *pfdhps* Ser/Leu-436 avec une fréquence de 58,5 % (24/41) était observée à Bonoua. Les mutations I-51, R-59 et N-108 étaient portées respectivement par 15/46 (32,6%), 23/46 (50%) et 22/46 (47,8%) des isolats de *P. falciparum* de Bonoua.

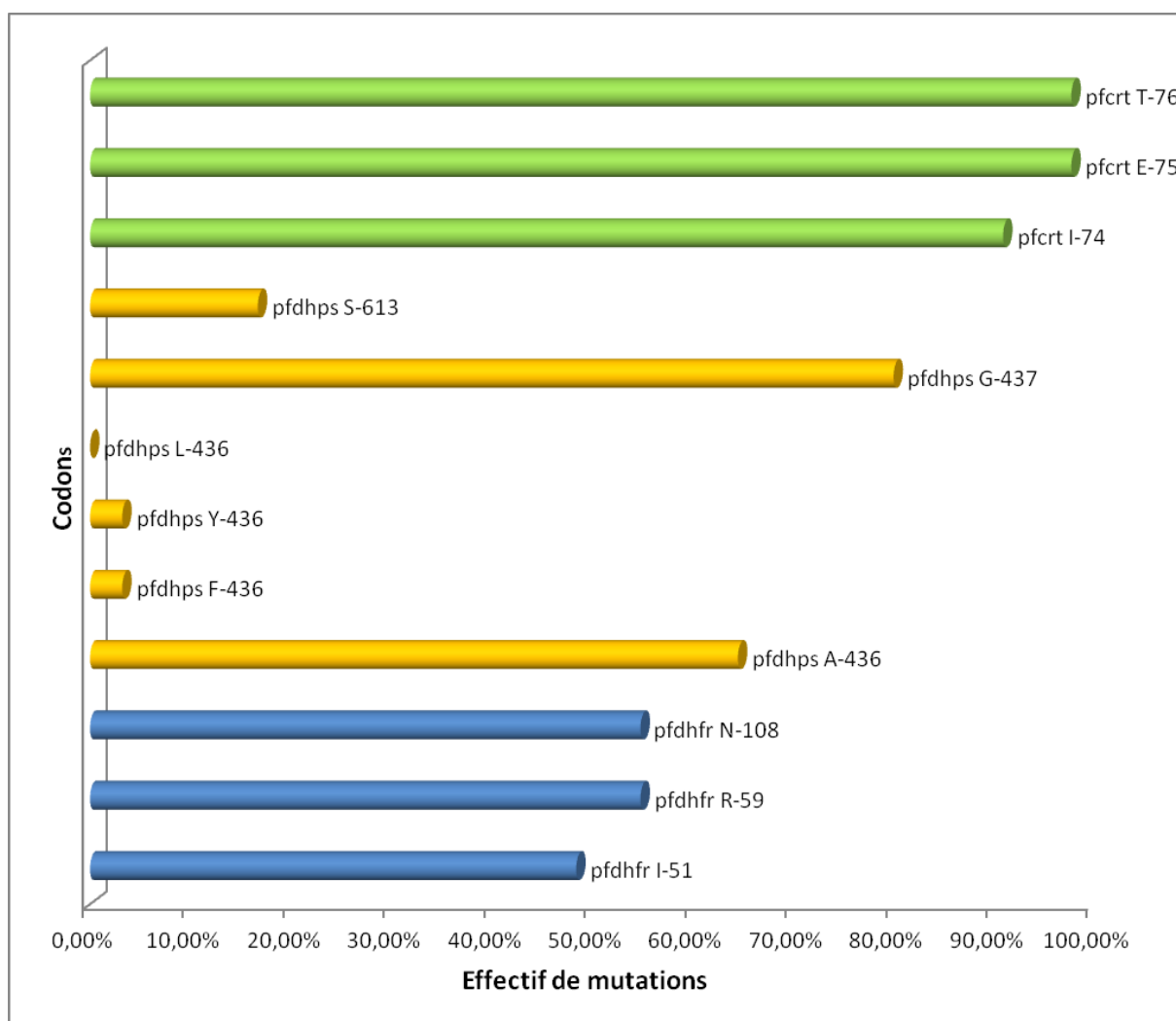


Figure 13 : Fréquence des mutations des codons des gènes *pfcr1*, *pfdhps* et *pfdhfr* des isolats de *P. falciparum* à Samo

La mutation principale *pfdhfr* N-108 était retrouvée chez 39/77 (50,6%) des isolats. Le locus 436 du gène *pfdhps* était très polymorphe avec cinq allèles dont les mutations rares *pfdhps* Y-436, *pfdhps* F-436.

Les mutations T-76, E-75 et I-74 du gène *pfcr1* étaient portées respectivement par 91/92 (98,9%), 91/92 (98,9%) et 88/92 (96,7%) des isolats de *P.falciparum* à Samo.

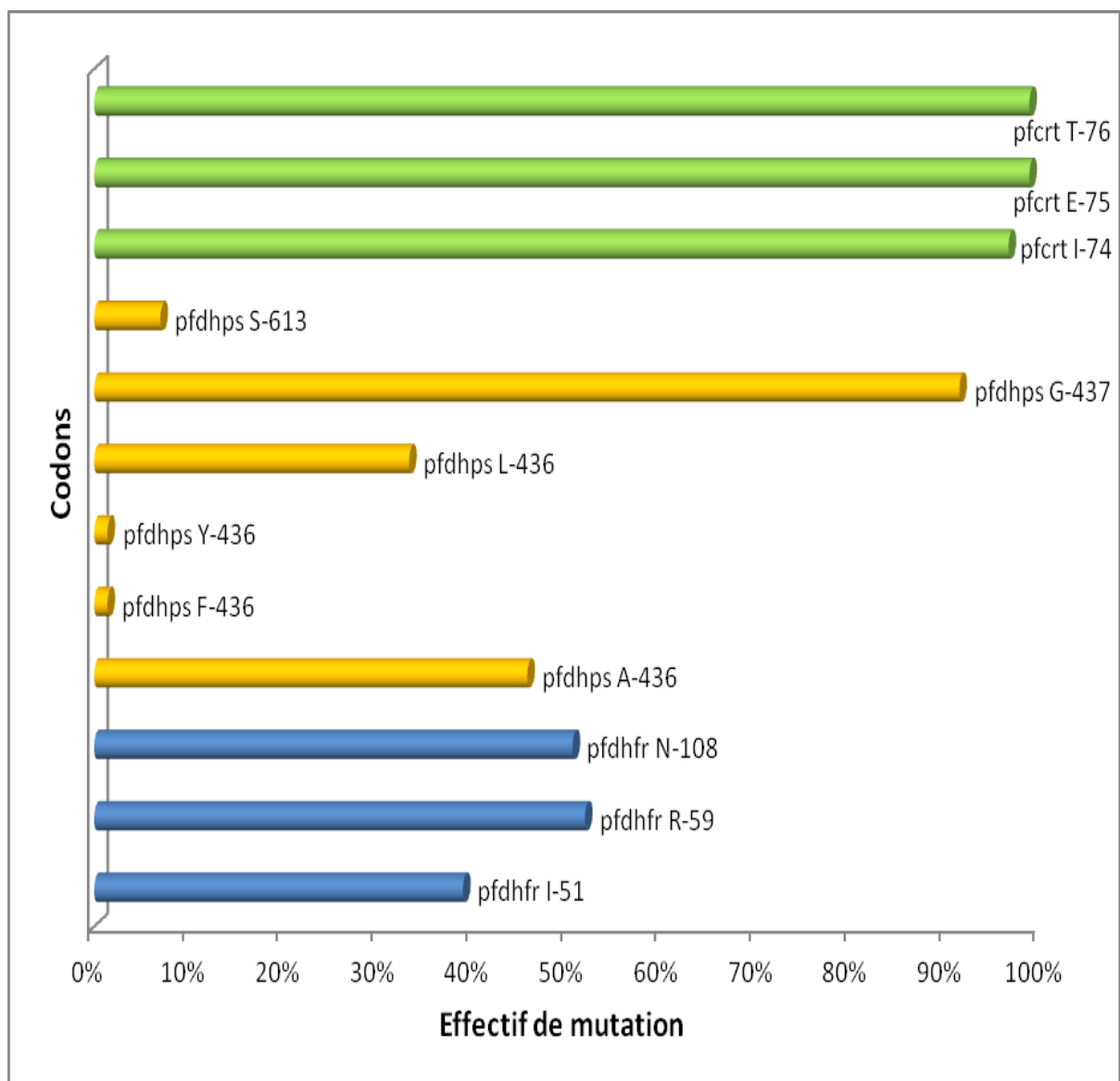


Figure 14 : Fréquence des mutations des codons des gènes *pfdhfr*, *pfdhps* et *pfcr1* des isolats de *P. falciparum* à Bonoua et Samo

En comparant les résultats des deux sites distants seulement de 7 km environ, la mutation *pfdhps* G-437 était retrouvée chez 80 % et 100 % des isolats à Samo et Bonoua respectivement ($p = 0,001$). Les mutations *pfcr1* I-74, *Pfcr1* G-75, *pfcr1* T-76 étaient retrouvées à Bonoua (100%) et non à Samo ($p = 0,001$; $p = 0,04$; $p = 0,04$).

III. DISCUSSION

Le présent travail est basé sur l'analyse des séquences des gènes *dhfr*, *dhps* et *crt* chez les isolats de *P. falciparum* provenant de sujets asymptomatiques et symptomatiques d'Anonkoua-kouté ainsi que des sujets symptomatiques de Bonoua et Samo. La démarche idéale aurait été de réaliser ces études moléculaires en parallèle avec l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de la sulfadoxine-pyriméthamine et de la chloroquine pour établir la corrélation entre « phénotype échec thérapeutique » et marqueurs moléculaires de résistance *dhfr* et *dhps* à la sulfadoxine-pyriméthamine et *crt* à la chloroquine. Malheureusement à l'heure actuelle, de telles études deviennent difficiles à envisager, puisque les autorités sanitaires de Côte d'Ivoire recommandent respectivement en traitement de première et seconde lignes les associations artésunate-amodiaquine et artéméther-luméfantine dans le traitement du paludisme simple à *P. falciparum* depuis 2005. La sulfadoxine-pyriméthamine est exclusivement préconisée dans le traitement préventif intermittent chez la femme enceinte. La chloroquine quant à elle est proscrite depuis 2003 dans le traitement du paludisme simple à *P. falciparum* en Côte d'Ivoire et dans la chimioprophylaxie chez la femme enceinte (Anonyme, 2008).

La surveillance de l'activité de la pyriméthamine, de la sulfadoxine et de la chloroquine par le test de chimiosensibilité *in vitro* nécessiterait la mobilisation de beaucoup de ressources en matériels et en formation de personnels et une standardisation du protocole. Il est prouvé qu'il existe une forte corrélation entre la présence des mutations sur les gènes *dhfr*, *dhps*, *crt* et la réponse *in vitro* à la sulfadoxine-pyriméthamine et à la chloroquine respectivement (Djaman, 2003 ; Biswas, 2004 ; Bacon *et al.*, 2009 ; Nsohya *et al.*, 2010 ; Okombo *et al.*, 2010).

En général la présence des marqueurs moléculaires de résistance est 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 antimétabolites qui ont

généralement un mécanisme de résistance simple, les marqueurs génomiques de résistance peuvent remplacer les tests *in vitro* pour les études épidémiologiques (WHO, 2005).

Les travaux de Djaman (2003) montrent une corrélation parfaite d'une part entre le phénotype « échec thérapeutique » à la SP et les marqueurs de résistance *dhfr* et *dhps* et d'autre part entre phénotype « échec thérapeutique » à la chloroquine et marqueur de résistance *crt*. Dans cette étude les isolats *dhfr* mutants étaient portés par 86 % des enfants ayant un échec thérapeutique à la sulfadoxine-pyriméthamine et les mutants *dhps* étaient présents chez 100 % de ces enfants.

Toutefois, l'existence de mutants *pfcr* sensibles à la chloroquine 50 a été signalée. Cela serait dû à l'effet additionnel de l'immunité antipalustre chez les sujets prémunis ou serait le fait de mécanismes additionnels de la chloroquinorésistance impliquant d'autres transporteurs (Jiang *et al.*, 2005).

Aussi l'étude de Picot *et al.* (2009) portant sur une revue et une méta-analyse de 92 travaux a montré une corrélation entre les marqueurs moléculaires de résistance à la CQ et à la SP et l'issue du traitement du paludisme simple à *P. falciparum*.

III.1. Niveau de résistance moléculaire de *P. falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine à Anonkoua-kouté, Bonoua et Samo

Chez *P. falciparum*, la résistance à la pyriméthamine est essentiellement acquise à la suite de mutations ponctuelles successives au niveau du gène *dhfr* en particulier au niveau du codon 108 par remplacement de la sérine par une asparagine. Deux ou trois mutations additionnelles qui affectent en plus du codon 108, les codons 51, 59 et rarement les codons 16 (en association avec Thr-108) et 164 élèvent le niveau de la résistance.

A Anonkoua-kouté le triple mutant était retrouvé chez 46,6% de l'ensemble des isolats traduisant ainsi un niveau de résistance élevée de *P. falciparum* à la SP

dans la mesure où les triples mutations 51/59/108 confèrent au *Plasmodium* une forte résistance à la pyriméthamine (Enosse *et al.*, 2008 ; Ibrahim *et al.*, 2008).

A Anonkougou-kouté 34,6%, 51,1% et 14,3% des isolats portaient respectivement des allèles sauvages, mutants purs et mixtes du gène *pf_{dhfr}*.

En Côte d'Ivoire, les travaux de Djaman *et al.* (2010) réalisés de février à décembre 2006 à Yopougon, un autre quartier d'Abidjan ont mis en évidence une prévalence de l'allèle N-108 dans 46,4% des isolats étudiés dont 9% d'isolats *dhfr* mutants purs. La proportion des isolats *dhfr* sauvages étaient de 72,9% contre 27,1% d'isolats *dhfr* mutants.

Les deux études moléculaires effectuées à Abidjan dans deux quartiers différents montrent une augmentation de la proportion d'isolats mutants, notamment ceux portant les triples mutations sur le gène *dhfr*. Par rapport aux résultats de l'étude de Djaman, nous avons observé des fréquences élevées d'allèles mutés de *dhfr*. Ainsi la mutation additionnelle 51 a été retrouvée chez 52,2% des isolats de notre étude contre 22,6 % dans l'étude de Djaman *et al.*(2010) La mutation additionnelle 59 était portée par 60, 9% d'isolats dans notre étude contre 31% dans celle de Djaman *et al.*(2010) Quant à la mutation clé 108 elle était retrouvée chez 61,7% d'isolats contre 46,4% dans celle de Djaman *et al.*(2010)

Des mutations rares notamment les simples mutants ou doubles mutants aux codons 51 et 59 ont été mis en évidence dans notre étude. Les simples mutants I-51 et R-59 étaient retrouvés respectivement chez 3,7% et 2,3% des isolats tandis que le double mutant I-51/R-59 était porté par 2,3% des isolats. La corrélation entre ces simples mutations de ces deux codons et le phénotype échec thérapeutique n'a pas encore été étudié dans les travaux précédents (Kublin *et al.*, 2003 ; Picot *et al.*, 2009 ; Dicko *et al.*, 2010).

Des travaux portant à la fois sur les tests *in vivo* et *in vitro* ainsi que les tests moléculaires pourraient permettre d'établir ou non une corrélation entre phénotype échec thérapeutique et simple ou double mutation des codons 51 et 59.

En 2003, les travaux du même auteur (Djaman, 2003) ont montré que 73% des isolats (105/144) portaient le génotype sauvage contre 27% pour le génotype mutant avec respectivement 5%, 13% et 9% pour le simple, double et triple mutant.

Cette différence se reflète dans la proportion des isolats portant les triples mutations en *dhfr*, c'est-à-dire, 9 % selon Djaman (2003) et 46,6 % selon notre étude.

La différence entre les résultats pourrait s'expliquer par les zones et les périodes d'étude, la pression médicamenteuse. D'autre part l'utilisation du Triméthoprim/sulfaméthoxazole qui présente une réaction croisée avec la SP pourrait expliquer l'augmentation du nombre de mutants.

A Bonoua et Samo, en zone rurale, la mutation clé pure *pf dhfr* N-108 associée aux mutations R-59 (41,9% à Samo et 50% à Bonoua) et I-51 (19,4% à Samo et 32,6% à Bonoua) était présente chez 45,2% et 52,2% des isolats respectivement. Ces résultats démontrent un niveau de résistance élevée de *P. falciparum* à la pyriméthamine dans les deux localités. A Adzopé cette mutation était retrouvée chez 35,4% des isolats étudiés (Ouattara *et al.*, 2010).

Ces résultats montrent une résistance élevée à la pyriméthamine à Anonkouakouté à Abidjan, à Bonoua et Samo. Ce niveau de résistance pourrait s'expliquer par une forte pression médicamenteuse exercée sur le parasite. Cette forte pression médicamenteuse aurait pour origine l'utilisation continue de la SP dans le traitement curatif du paludisme simple malgré les recommandations du PNL. En effet la SP reste toujours disponible dans les pharmacies et donc accessible à la population.

Les travaux de Mtawa *et al.* (2008) en Zambie et ceux de Kim *et al.* (2004) au Cambodge ont également montré les mutations sur les codons 51/59/108 (AIRNI) avec une prévalence presque similaire en Zambie (41,3%) mais largement inférieure par rapport au Cambodge (91%). Ces résultats tendent à confirmer la thèse de la propagation des mutants *dhfr* de l'Asie du sud vers

l'Afrique (Mita *et al.*, 2009a). Ces données concordent aussi avec celles de Mita *et al.* (2009b) qui affirment que les haplotypes des triples mutants de 12 pays d'Afrique dont la Côte d'Ivoire sont identiques à ceux de l'Asie du Sud. La mutation L-164 caractéristique d'une forte résistance aux antifolates en Asie et au Cambodge (Kim *et al.*, 2004) n'a pas été retrouvée dans notre étude. Ces résultats sont en accord avec l'analyse de Mita *et al.* (2009a) et confirment la prédominance du mutant CIRNI en Afrique et celle du mutant CICNL en Asie (Thaïlande). La mutation L-164 n'a pas été également mise en évidence par Djaman *et al.* (2003, 2010).

Il convient donc de poursuivre la surveillance de la résistance de *P. falciparum* aux antifoliques et aux antifoliniques par le test moléculaire afin de déceler l'apparition éventuelle de cette mutation dans notre pays.

L'analyse du gène *pf dhps* à Anonkoua-kouté a montré que la prévalence des isolats *dhps* mutants était la plus élevée avec 70,20%, suivie de celle des isolats *dhps* mixtes (25 %) et enfin les isolats *dhps* sauvages (4,80%). Les mutations portaient sur les codons 436, 437, 581 et 613.

A Samo et Bonoua la prévalence de la mutation *dhps* G-437 était très élevée avec 80% et 100% respectivement.

Les travaux de Djaman *et al.* (2010) réalisés sur le terrain en 2006 ont mis en évidence 6,6% d'isolats *dhps* sauvages contre 93,4 % d'isolats *dhps* mutants. Les mutations portaient sur les codons 436, 437 et 613 dans cette étude. Ces résultats confirment la forte résistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine dans notre pays notamment à Abidjan traduisant ainsi une forte pression médicamenteuse.

La mutation G-540 n'a pas été mise en évidence dans notre étude ni dans celle de Djaman *et al.* (2010). Cependant la mutation G-540 a été retrouvée ailleurs en Afrique (Dicko *et al.*, 2010 ; Malisa *et al.*, 2010 ; Salgueiro *et al.*, 2010).

Selon des études menées en Afrique de l'Est, où les prévalences des codons mutés G-540 et G-437 sur le gène *dhps* et des triples mutations sur le gène *dhfr*

(quintuple mutations (I-51/R-59/N-108 *pfdhfr* et G-437/E-540 *pfdhps*) sont élevées, le codon G-540 serait un marqueur moléculaire majeur associé à l'échec thérapeutique chez les malades traités à la sulfadoxine-pyriméthamine (Gesase *et al.*, 2009 ; Picot *et al.*, 2009). Les allèles quadruples mutants dans lesquels le triple mutant IRN était associé à la mutation G-437 étaient majoritaires dans notre étude.

Ailleurs en Afrique et dans le monde, des études réalisées ont confirmé les résultats de nos travaux quant à une forte résistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine (Eshetu *et al.*, 2010 ; Spalding *et al.*, 2010 ; Sridaran *et al.*, 2010) consecutive à une forte pression médicamenteuse sur le parasite.

En effet, la SP selon les directives du PNLP, devrait être proscrite en traitement curatif du paludisme simple à *P. falciparum* dans le pays.

Aussi l'antifolate sulfaméthoxazole + triméthoprime présente une résistance croisée avec la SP et sa large utilisation en Afrique notamment en Côte d'Ivoire pour traiter les infections bactériennes et prévenir les affections opportunistes liées au VIH/SIDA (Henry *et al.*, 2002) pourrait maintenir une pression sélective favorisant les souches de *P. falciparum* résistantes à la SP (Iyer *et al.*, 2001). Cependant des études conduites en Ouganda et au Mali ont montré que la chimioprophylaxie à la sulfaméthoxazole+triméthoprime ne pouvait pas entraîner une augmentation du niveau de résistance de *P. falciparum* aux antifolates (Mermin *et al.*, 2005 ; Thera *et al.*, 2005 ; Hamel *et al.*, 2008).

De récentes études effectuées ailleurs dans le monde ont montré un niveau très élevé de la résistance de *P. falciparum* à la SP (Eshetu *et al.*, 2010 ; Sridaran *et al.*, 2010).

Cette résistance élevée notée dans les trois sites d'étude peut remettre en cause l'efficacité du TPI chez la femme enceinte. Des mesures urgentes telles que le retrait effectif de la SP en traitement curatif devraient être prises par les autorités sanitaires du pays.

La possibilité selon laquelle la stratégie du TPI élargi à l'enfant pourrait induire

une augmentation de la résistance de *P. falciparum* à la SP fait l'objet de débat (Sokhna *et al.*, 2008 ; Dicko *et al.*, 2010 ; Menendez *et al.*, 2011). Des études ont montré que les gamétocytes générés après traitement avec la SP présentaient une prévalence élevée de mutations *pfdhfr* et *pfdhps* à celle des parasites asexués avant traitement dans la même population démontrant que la sélection médicamenteuse favorisait la transmission de gamétocytes résistants au moustique vecteur (Mendez *et al.*, 2002; Sowunmi & Fateye, 2003; Hallett *et al.*, 2006). Par conséquent on aurait une augmentation et une expansion de la résistance. Cependant l'infectivité des gamétocytes chez le moustique vecteur après traitement avec la SP fait l'objet de controverse (Hogh *et al.*, 1998; Targett *et al.*, 2001; Oesterholt *et al.*, 2009). Ainsi pendant que des auteurs démontraient une baisse de l'infectivité des gamétocytes (Hogh *et al.*, 1998 ; Robert *et al.*, 2000 ; Beavogui *et al.*, 2010 ; Kone *et al.*, 2010) après traitement avec la SP d'autres par contre révélaient une augmentation de l'infectivité de ces gamétocytes (Mendez *et al.*, 2002 ; Hallett *et al.*, 2006 ; Mendez *et al.*, 2007).

La pression médicamenteuse semble être le facteur clé de la résistance de *P. falciparum* à la SP. Des modélisations ont été proposées dont celle de la régulation des clones infestants en fonction de la fréquence initiale des allèles chimio-résistants, de la dynamique de la résistance sous pression médicamenteuse, du seuil de résistance en dessous duquel la résistance n'évolue pas (Hastings, 1997). L'émergence de la chimio-résistance est facilitée par la pression médicamenteuse pour les résistances causées par un nombre limité de gènes tel que *pfdhfr* et du fait d'une compétition entre les clones co-infestant l'hôte. Les clones chimio-résistants présents au début de la pression médicamenteuse ont une moindre probabilité de survie que ceux qui les suivront, ceci dépendant de la vitesse de stabilisation de la population de parasites après le début d'utilisation du médicament (Hastings & Mackinnon, 1998). La probabilité de survie d'un clone résistant augmenterait linéairement avec la pression médicamenteuse, la pente étant fonction du niveau de

transmission.

Ainsi réduire l'utilisation de la SP en la réservant exclusivement pour le TPI chez la femme enceinte par exemple pourrait entraîner une réversion de la résistance de *P. falciparum* à la SP. Ce qui pourrait rendre cette molécule moins chère et d'administration facile, de nouveau efficace en traitement curatif du paludisme. Ainsi elle pourrait toujours être préconisée dans le TPI non seulement de la femme enceinte mais également celui de l'enfant en particulier dans les zones à transmission palustre intense.

III.2. Niveau de résistance moléculaire de *P. falciparum* à la chloroquine à Anonkoua-kouté, Bonoua et Samo

La chloroquine a été utilisée depuis plusieurs années en traitement curatif du paludisme simple et en chimioprophylaxie chez la femme enceinte.

Les forts taux de résistance à la chloroquine ont contraint en 2003 les autorités sanitaires du pays à remplacer la chloroquine par la sulfadoxine-pyriméthamine en traitement de première ligne du paludisme simple à *P. falciparum*. Officiellement la CQ a donc été retirée à cette date. Depuis cette période aucune étude d'efficacité thérapeutique portant sur la chloroquine n'a été réalisée dans le pays.

L'analyse du gène *pfcr*t devrait nous permettre d'apprécier le niveau de résistance à la CQ cinq ans après son retrait de l'arsenal thérapeutique antipaludique dans notre pays. En effet des travaux conduits en Côte d'Ivoire et en Afrique de l'Ouest ont montré une corrélation étroite entre la mutation *pfcr*t T-76 et échec thérapeutique ou résistance *in vitro* de *P. falciparum* à la chloroquine (Djaman *et al.*, 2007; Figueiredo *et al.*, 2008; Bridges *et al.*, 2009).

A Anonkoua-kouté le triple mutant pur *pfcr*t I-74/E-75/T-76 était dominant avec 65,7% contre 12,1% et 18,2% respectivement pour l'allèle sauvage *pfcr*t M-74/N-75/K-76 et les allèles mixtes. Le triple mutant *pfcr*t I-74/E-75/T-76 était présent chez 16 allèles mixtes. Ainsi donc le triple mutant était porté par 81,8%

des isolats.

A Bonoua, le triple mutant pur *pfprt* I-74/E-75/T-76 était retrouvé chez tous les isolats tandis qu'à Samo il était prédominant avec une fréquence de 86,4%.

Tous ces résultats démontrent le niveau élevé de résistance à la chloroquine à Anonkoua-kouté, Bonoua et Samo. Les travaux de [Djaman *et al* \(2010\)](#) ont mis en évidence la présence de la mutation 76-T chez 65,3% des isolats de 2006 à Abidjan.

A Adzopé la prévalence de la mutation 76-T était de 62,2% et le triple mutant était retrouvé chez 57,3% des isolats ([Ouattara *et al.*, 2010](#)).

Ces résultats suggèrent donc que le niveau de résistance à la CQ reste élevé dans notre pays malgré l'abandon de cette molécule en traitement du paludisme simple en 2003. Ce qui contraste avec des études antérieures qui ont montré que le retrait de la chloroquine favorisait une réversion de la chloroquinorésistance après quelques années en Afrique particulièrement au Kenya et au Malawi ([Kublin *et al.*, 2003](#) ; [Laufer *et al.*, 2006](#)). Cette diminution de la prévalence de la mutation K-76T après retrait de la chloroquine a été également notée en Chine ([Laufer & Plowe, 2004](#) ; [Wang *et al.*, 2005](#)).

Le niveau élevé de résistance à la CQ dans notre étude pourrait s'expliquer par l'utilisation continue du médicament, maintenant ainsi la pression médicamenteuse. En effet la chloroquine a été totalement retirée du marché en 2007 après la prise d'un arrêté ministériel. La chloroquine malgré son retrait en traitement curatif en 2003 a toujours été prescrite partout dans le pays jusqu'en 2007. Ce qui justifierait les niveaux élevés actuels de chloroquinorésistance.

Il se peut aussi que la CQ soit toujours utilisée sur le marché parallèle des antipaludiques d'où un maintien de la pression de sélection des mutants résistants à ce médicament ([Legris, 2005](#) ; [Granado *et al.* 2009](#) ; [Frosch *et al.* 2011](#)). Les flux migratoires des populations pourraient également être à l'origine du maintien du niveau élevé de la chloroquinorésistance sur les sites d'étude. En effet Bonoua et surtout Samo accueillait au moment de cette étude une

population importante de manœuvres agricoles en majorité du Burkina Faso.

La prévalence élevée de *pfcr*t 76-T pourrait également être attribuée au fait que des mutations en amont et en aval ont maintenu l'intégrité fonctionnelle de la protéine trans-membranaire même en l'absence de pression médicamenteuse. Ainsi, le retrait de la molécule ne compromet pas l'aptitude des parasites mutants (Laufer & Plowe ; 2004 ; Hastings & Donnelly, 2005 ; Wang *et al.*, 2005).

Il est bien établi que les mutations qui rendent un organisme résistant sont probablement associées à une perte de caractères génétiques. Par conséquent les organismes portant ces mutations seront moins nombreux que ceux sensibles lorsque la pression médicamenteuse est réduite ou supprimée (Austin & Anderson, 1999; Walliker, 2005).

Des études ont montré que la sélection de la résistance à la chloroquine était associée à une perte du caractère génétique dans le cas du paludisme chez la souris et ce phénomène a été également observé avec les antipaludiques tels que la pyriméthamine et l'atovaquone (Shinondo *et al.*, 1994 ; Peters *et al.*, 2002).

Dans certains cas, la perte du caractère génétique peut être associée à l'élaboration de mécanismes compensatoires conduisant à la persistance du parasite mutant dans la population malgré l'arrêt du médicament. Cette caractéristique pourrait expliquer, au moins en partie, la persistance de *pfcr*t-76 T dans certaines parties de l'Asie du Sud-est et de l'Amérique du Sud où la CQ n'a pas été utilisée dans ces régions depuis de nombreuses années (Vieira *et al.*, 2001 ; Cortese *et al.*, 2002).

Les taux de régression de la chloroquinorésistance varient aussi selon l'intensité de la transmission. Dans les zones de transmission intense, la majorité des infections sont génétiquement mixtes permettant une compétition entre clones parasitaires présentant des caractères génétiques différents. Au contraire, dans les zones de transmission faible comme en Asie et dans la région amazonienne la plupart des infections plasmodiales sont caractérisées par un seul clone et des clones distinctifs ou génotypes de *P. falciparum* peuvent être prédominants sur

de grandes zones ou grands espaces (Anderson *et al.*, 2000 ; Cortese *et al.*, 2002).

Dans ces conditions, la compétition directe entre parasites sensibles et résistants à la chloroquine pourrait être limitée permettant aux parasites résistants de se fixer dans la population après le retrait de la chloroquine. Ce qui ne devrait pas être le cas dans les zones à transmission intense où le brassage des populations plasmodiales est plus important d'où une régression du niveau de résistance en cas de levée de la pression de sélection des mutants liée au retrait de la chloroquine.

Aussi importe-t-il que les mesures de retrait de la chloroquine de l'arsenal antipaludique soient strictement respectées par la population en vue d'entrevoir un retour de ce médicament seul ou en association dans le traitement du paludisme.

III.3. Différence de niveau de résistance entre Samo, Bonoua et Anonkoua-kouté

La différence de niveau de résistance entre Bonoua et Samo distants seulement d'environ 5 Kms était frappante. A Samo, en zone rurale, les infections mixtes étaient plus fréquentes qu'à Bonoua en zone semi-rurale et un nombre d'allèles rares y a été observé. Plusieurs facteurs pourraient expliquer cette différence notamment l'urbanisation, l'exode rural, les activités agricoles, la densité anophélienne et les flux migratoires des populations.

La distribution des isolats résistants à la CQ et à la SP reflète le niveau d'urbanisation entre Samo et Bonoua. Les travaux de Soulama *et al.* (2009) au Burkina Faso portant sur la distribution des génotypes et le polymorphisme allélique des gènes *msh1* et *msh2* ont montré une différence entre zones rurale et urbaine (Soulama *et al.*, 2009). La prévalence des infections mixtes à Samo suggère une transmission plus intense dans cette zone. Les activités agricoles notamment la culture de maïs, de l'ananas, principale culture à Samo et la

riziculture sont d'excellents foyers pour la reproduction des moustiques (Colin *et al.*, 2007 ; Matthys *et al.*, 2006 ; Asenso-Okyere *et al.*, 2011 ; Matthys *et al.*, 2010).

Certains auteurs ont montré que la diversité génétique et la résistance aux antipaludiques étaient plus importantes en zone urbaine qu'en zone rurale en raison de l'exode rural qui permettait le transfert des parasites en zones urbaines. Dans notre étude les flux migratoires des populations en provenance des pays limitrophes en particulier du Burkina-Faso et même de la Côte d'Ivoire du fait de la culture d'ananas à Samo pourraient expliquer la distribution des génotypes entre Samo et Bonoua (Bogreau *et al.*, 2006 ; Meissner *et al.*, 2008).

Nos résultats à Samo semblent confirmer ceux de Sutherland *et al.* (2009) qui montrent que les haplotypes AGK et SGK sont fréquemment rencontrés en Afrique de l'Ouest et chez les voyageurs provenant de cette région d'Afrique.

L'hétérogénéité de la population à Samo semble être un facteur déterminant dans la prévalence élevée de la diversité génétique.

La prévalence de la mutation G-437 était plus élevée à Bonoua (100%) qu'à Samo (73%) et était associée à l'allèle A-436. L'allèle mutant G-437 faisait partie de tous les trois haplotypes mutants retrouvés dans la région. En fait, il est inhabituel de retrouver une prévalence élevée d'allèles mutants *pf dhps* dans les populations parasitaires lorsque la prévalence du triple mutant *pf dhfr* n'est pas élevé comme noté à Bonoua et Samo. Cela suggère un usage massif des sulfamides par les populations, source d'une intense pression médicamenteuse sur *P. falciparum* à Samo et Bonoua. Il en est de même pour Anonkoua Kouté.

Il existe une différence de niveaux de résistance à la CQ et à la SP dans nos trois sites d'étude. En zone péri-urbaine d'Anonkoua kouté le niveau de résistance à la SP est plus élevé qu'en zone rurale du fait probablement d'une pression médicamenteuse de la SP sur le parasite plus forte qu'en zone rurale (Samo et Bonoua). A contrario la résistance à la CQ est plus élevée en zone rurale qu'en zone périurbaine probablement due également à une pression de la CQ plus

intense sur le parasite.

Le niveau relativement élevé des génotypes mixtes à Anonkoua-kouté et à Samo traduit l'hétérogénéité des populations parasitaires dans ces deux sites d'étude comparativement à Bonoua où un polymorphisme restreint existerait dans les populations de *P. falciparum*. Les infections mixtes démontrent qu'une personne infectée l'est en réalité par plusieurs souches de *P. falciparum* témoignant ainsi du niveau élevé de transmission du paludisme dans ces zones. En effet, en zone de transmission élevée, le repas anophélien comporterait en moyenne 3 génotypes, ce qui suffit à assurer une recombinaison méiotique chez *P. falciparum* plus élevée que chez l'homme. Ce fort taux de recombinaison effacerait très rapidement le déséquilibre de liaison des loci distants de plus de 0,3 Kb (Conway *et al.*, 1999). Ainsi les infestations humaines sont polyclonales et les recombinaisons de méiose des parasites sont fréquentes dans les régions de paludisme stable à fort polymorphisme de *P. falciparum*.

Conclusion

L'émergence et la propagation de la résistance de *P. falciparum* à la plupart des antipaludiques en particulier la chloroquine, l'amodiaquine, la sulfadoxine-pyriméthamine et aujourd'hui les dérivés de l'artémisinine rendent de plus en plus difficile la prise en charge de la maladie. La présente étude avait pour but d'analyser par séquençage automatique les gènes *pfdhfr*, *pfdhps* et *pfcr1* impliqués dans la résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine et à la chloroquine. Ce travail a mis en évidence un niveau de résistance élevé à la SP et à la Chloroquine à Anonkoua-kouté, Bonoua et Samo lié principalement à une forte pression médicamenteuse exercée sur le parasite.

Ce niveau de résistance à la SP pourrait mettre en péril les effets bénéfiques du TPI avec la SP chez la femme enceinte Il est donc urgent d'évaluer de façon régulière l'efficacité de la SP en TPI dans cette population.

Notre étude est une évaluation indirecte de l'efficacité des CTA. En effet, selon la loi biologique, une molécule efficace devrait avoir une action suppressive des isolats de *P. falciparum* résistants à des molécules anciennes. Ainsi, plus on utilise les nouvelles molécules plus on supprime la biomasse parasitaire résistante aux premières molécules. A terme l'utilisation efficiente des CTA va rompre l'équilibre en faveur des isolats sensibles aux premières molécules mais sélectionnera de nouveaux isolats résistants aux CTA. Dans tous les cas on reviendra quelques années après aux premières molécules (cas de la chloroquine au Malawi). L'évaluation des CTA s'avère donc nécessaire au vue des résultats de cette étude.

*Chapitre II : Efficacité comparée du
Traitement Préventif Intermittent Non
Contrôlé versus Contrôlé avec la sulfadoxine-
pyriméthamine chez les femmes enceintes en
zones de résistance élevée de
P. falciparum de Côte d'Ivoire*

Introduction

En Afrique Sub-saharienne, approximativement 30 millions de femmes enceintes sont à risque de paludisme chaque année et une femme sur quatre présente une infection placentaire évidente à l'accouchement ([Mockenhaupt et al., 2006](#)). La chimioprophylaxie avec la chloroquine a été longtemps recommandée mais en réponse à l'émergence, l'expansion rapide de la résistance et une mauvaise observance en particulier avec la chloroquine, l'OMS a opté pour le TPI ([WHO, 2006](#)).

Le TPI avec la SP a largement prouvé son efficacité (diminution de la morbidité, augmentation du poids de naissance de l'enfant etc....) dans les régions où ce médicament est encore efficace ([Briand et al., 2009](#) ; [Gies et al., 2009](#); [Tiono et al., 2009](#) ; [Menendez et al., 2010](#)). Aujourd'hui donc la presque totalité des pays en zone d'endémie ont adopté le TPI avec la sulfadoxine-pyriméthamine comme chimioprophylaxie chez la femme enceinte sous l'impulsion de l'OMS.

Cependant les chimiorésistances constituent un des obstacles majeurs à une prise en charge optimale du paludisme. La résistance à la SP est aujourd'hui élevée autant en Afrique de l'Est qu'en Afrique de l'Ouest, même si certains foyers à l'est sont à un degré plus élevé ([Gesase et al., 2009](#) ; [Deloron et al., 2010](#) ; [Sridaran et al., 2010](#)).

Dans de nombreux pays endémiques à l'image de notre pays, le niveau de résistance à la SP pourrait remettre en cause l'efficacité de la SP en chimioprophylaxie du paludisme chez la femme enceinte. Ainsi des questions concernant l'efficacité du TPI avec la SP dans ce contexte de résistance sont régulièrement soulevées. C'est pourquoi une augmentation du nombre de doses et l'évaluation de nouvelles molécules en TPI sont proposées ([White, 2005](#) ; [Ter Kuile et al., 2007a](#) ; [Menendez et al., 2010](#)).

L'OMS recommande aujourd'hui le génotypage des gènes *pfdhfr* et *pfdhps*, méthode couramment utilisée en épidémiologie moléculaire pour déterminer le niveau de résistance de *P. falciparum* à la SP.

Dans la précédente étude conduite simultanément avec la présente étude, la prévalence des parasites mutants purs *dhfr* et *dhps* était respectivement de 51,1% et 70,2% à Anonkoua-kouté. A Samo les fréquences des mutations *pfdhps* Gly-581 et Gly-437 étaient respectivement de 100% et 73% tandis que la mutation principale *pfdhfr* Asn-108 était retrouvée chez 45,2 % des isolats.

Cette étude a également montré en comparaison à celles de [Djaman et al.](#) réalisées en 2003 et 2006, une augmentation très significative du niveau de résistance à la SP malgré le retrait de cette molécule en traitement curatif du paludisme simple en 2005.

Peu d'études ont porté sur l'étude des marqueurs moléculaires de résistance chez les femmes enceintes ([Mockenhaupt et al., 2008](#) ; [Bouyou-Akotet et al., 2010a](#)).

La prévalence des mutants résistants *pfdhfr* et *pfdhps* chez les femmes enceintes ne semble pas être très différente de celle observée dans la population générale ([Deloron et al., 2010](#)).

Le niveau de résistance à partir duquel le TPI avec la SP serait inefficace reste une inconnue et impose de ce fait une évaluation régulière et continue de cette molécule en TPI chez la femme enceinte.

L'administration de la SP devrait se faire sous supervision directe dans les maternités selon les directives du PNLP. Des études ont montré que la prise de la SP sous observation directe (DOT) n'était pas respectée dans les maternités ([Akinleye et al., 2009](#) ; [Le Port et al., 2011](#) ; [Vanga-Bosson et al., 2011](#)). Ainsi la prévalence de l'infestation palustre placentaire demeurait élevée chez les femmes qui seraient soumises au TPI avec la SP.

Nous nous proposons dans ce travail de vérifier l'hypothèse selon laquelle la SP correctement prise est encore efficace contre *P. falciparum* en TPI, malgré le niveau de résistance élevée à cette molécule. Dans ce cas, il existerait peu de

parasites placentaires à l'accouchement chez les femmes ayant été correctement prises en charge lors des Consultations Périnatales (CPN). Il s'en suivra chez ces femmes, des prévalences moins importantes de bébés de faible poids de naissance comparées aux homologues sous TPI non contrôlé. De plus l'anémie maternelle sera moins importante dans ce groupe. Les femmes retrouvées porteuses de parasites dans le placenta, pourraient n'être qu'une petite fraction de celles qui ont été contaminées, la prophylaxie ayant joué son rôle dans la majorité des cas.

Pour vérifier cette hypothèse nous proposons de réaliser un essai ouvert randomisé évaluant l'efficacité du TPI contrôlé *versus* TPI non contrôlé à Anonkoua-kouté et à Samo zones de forte résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine. L'hypothèse testée est une hypothèse de supériorité du TPI contrôlé *versus* TPI non contrôlé. Le TPI contrôlé consiste en l'administration de la SP aux femmes enceintes sous observation directe par l'équipe de recherche. En ce qui concerne le TPI non contrôlé le médicament est remis aux femmes enceintes et l'administration se fait à domicile sans aucune supervision.

Objectif général

Le présent travail se propose d'évaluer l'efficacité du TPI par la SP dans deux zones (Anonkoua-kouté et Samo) de forte résistance à ce médicament en Côte d'Ivoire.

Objectifs spécifiques

- Comparer la prévalence des bébés de faible poids de naissance chez les femmes sous TPI dans les deux groupes.
- Comparer la prévalence de l'infestation palustre placentaire dans les deux groupes
- Analyser l'anémie maternelle associée à l'infection palustre placentaire et la comparer dans les deux bras

- Apprécier la tolérance de la SP chez les femmes enceintes

I. MATERIEL ET METHODES

I.1. Matériel

I.1.1. Type et durée d'étude

Il s'agit d'un essai ouvert randomisé qui vise à évaluer l'efficacité du TPI avec la SP chez la femme enceinte dans deux zones de forte résistance de *P. falciparum*. L'étude s'est déroulée de janvier 2008 à mars 2009.

I.1.2. Zones d'étude

L'étude a été réalisée dans les maternités de la FSUCOM d'Anonkoua-kouté à Abobo et du Centre de santé Rural (CSR) de Samo.

Anonkoua-kouté est un village situé à la périphérie d'Abobo. Cette maternité reçoit en moyenne par an 1200 femmes enceintes au cours des CPN avec en moyenne 1100 accouchements. Elle est sous la supervision d'un Gynécologue et les accouchements sont assurés par 12 sages femmes diplômées d'Etat.

Les femmes enceintes viennent principalement du quartier d'Abobo mais essentiellement des sous quartiers Anonkoua-kouté I, II, III, Sagbé, PK18, Avocatier, tous situés dans un rayon de 5 km de la FSUCOM.

L'aire de santé de Samo comprend les villages de Samo, d'Abrobakro, d'Alohoré, de Medina, de Bondouk, de Mohamé et de Hébé.

La maternité du CSR de Samo est dirigée par une Sage femme diplômée d'Etat.

Le CSR de Samo reçoit non seulement des femmes provenant de ces villages mais également des femmes de la ville de Bonoua pour les CPN et les accouchements.

Le nombre de femmes enceintes se présentant en CPN est en moyenne de 1500 par an. La maternité enregistre en moyenne 700 accouchements par an.

I.1.3. Population d'étude

Critères d'inclusion

Pour être incluses dans l'étude, les femmes enceintes devraient :

- Consulter à Anonkoua-kouté et à Samo et habiter dans un rayon de 10 Km du site d'étude ;
- Etre âgées de plus de 15 ans et effectuer leur première CPN avant 6 mois de grossesse;
- Formellement accepter de venir effectuer au moins 2 autres CPN ;
- Prévoir consulter dans la même formation sanitaire en cas d'accès fébrile ;
- Accepter accoucher dans les maternités d'Anonkoua-kouté et de Samo ;
- Se conformer aux autres procédures de l'étude ;
- Etre consentante (signature d'un formulaire de consentement éclairé par la participante et/ ou son mari).

Critères d'exclusion

Les femmes étaient exclues du protocole en cas de :

- Grossesse à risque constatée par le responsable de la CPN ;
- Antécédents de réaction d'hypersensibilité aux sulfamides ou à d'autres médicaments ou d'une affection cutanée susceptible d'augmenter le risque de réaction indésirable grave aux médicaments testés (eczéma, exanthème pemphigoïde) ;
- Refus de consentement pour des raisons connues ou inconnues.

I.1.4. Taille de l'échantillon

La prévalence de l'infestation palustre placentaire en cas de TPI non contrôlé est estimée à 29% selon une étude précédente ([Offianan et al., 2007](#)). En considérant qu'une différence de 15% entre les deux types de TPI serait significative, avec un risque α de 5% et une puissance de 90% ($\beta=10\%$) le nombre de participantes nécessaires dans chaque groupe serait de 169.

En tenant compte des exclusions et des pertues de vue, un effectif de 200 participantes dans chaque groupe serait nécessaire.

I.2. Méthodes

I.2.1. Au screening

Un interrogatoire, un examen clinique et obstétrical complet étaient réalisés chez toutes les femmes enceintes venues en CPN dans les maternités de la FSUCOM d'Anonkoua-kouté et au CSR de Samo.

L'interrogatoire portait sur l'âge de la parturiente, la date des dernières règles afin de déterminer l'âge de la grossesse, la gestité, la parité, les antécédents médicaux (diabète, hypertension artérielle), chirurgicaux (césarienne) et gynéco-obstétricaux (avortement précoce ou tardif, prématurité, mort in-utéro, malformations congénitales) et d'allergie aux sulfamides. Il était également recherché à l'interrogatoire, l'utilisation d'une chimioprophylaxie, la survenue d'un paludisme et la prise éventuelle d'un antipaludique, l'usage d'une moustiquaire, les données sociodémographiques, un voyage éventuel en dehors du lieu habituel de résidence, le lieu éventuel de l'accouchement de cette grossesse.

L'examen clinique comprenait la prise des signes vitaux (tension artérielle, température, pouls), la prise de poids et de la taille de la parturiente. L'état général de la parturiente était apprécié ainsi que les conjonctives et les téguments à la recherche d'une anémie clinique. Un examen physique complet était réalisé à la recherche d'éventuelles anomalies.

L'examen gynéco-obstétrique comprenait l'examen des seins à la recherche d'un nodule éventuel, la détermination de la hauteur utérine à la recherche et/ou la confirmation de l'âge gestationnel et du périmètre ombilical. Le toucher vaginal (TV) était effectué afin d'apprécier l'état du col à la recherche d'une

menace éventuelle d'avortement ou d'accouchement prématuré. Enfin, les bruits actifs fœtaux étaient recherchés afin de déterminer la vitalité fœtale.

Lorsqu'une parturiente remplissait les critères d'inclusion, il lui était proposé de participer à l'étude. Aucune parturiente n'était incluse sans son consentement.

I.2.2. A l'inclusion

Toutes les femmes incluses ont bénéficié d'un bilan prénatal et d'une goutte épaisse ainsi que d'un frottis sanguin à la recherche d'un paludisme. En cas de goutte épaisse positive, les parturientes étaient prises en charge selon les directives du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) avec de la quinine en perfusion ou par voie orale selon l'état clinique.

Le bilan prénatal comprenait la glycémie, les sérologies de la toxoplasmose, de la rubéole et de la syphilis, le taux d'hémoglobine, l'électrophorèse de l'hémoglobine, le groupe sanguin rhésus, un examen cytobactériologique des urines (ECBU), une échographie à la première CPN et un mois avant l'accouchement. La sérologie VIH est de pratique courante dans les deux sites d'étude. Elle ne constituait pas un critère d'exclusion dans le cadre de ce travail. Il était donc proposé après consentement à chaque parturiente une sérologie au VIH dans le cadre de la Prévention de la transmission Mère-Enfant (PTME). Seules les parturientes consentantes ont effectué ce test.

I.2.3. Randomisation et mode d'administration des traitements

Les parturientes ont été randomisées selon un schéma de randomisation informatisé à l'aide du logiciel EPI Info version 6.0. Un membre de l'équipe de recherche qui ne participait pas aux autres activités de l'étude était chargé de préparer les enveloppes individuelles de randomisation suivant la liste générée par le logiciel. Les enveloppes étaient ensuite numérotées de façon croissante.

Bras TPI contrôlé avec la Sulfadoxine + Pyriméthamine

Le traitement se présente sous forme de comprimés dosés à 500 mg de Sulfadoxine et 25 mg de Pyriméthamine. Il est administré à deux reprises au cours de la grossesse.

La première dose est administrée à la première CPN en cas de mouvements actifs fœtaux ou après 16 semaines d'âge gestationnel. Dans le cas contraire elle est administrée à la CPN suivante. La deuxième dose est administrée un mois après la première dose. L'administration de la dose dans ce bras s'est faite sous observation directe par un membre de l'équipe de recherche qui ne prenait pas part aux autres procédures de l'étude.

Après l'administration du médicament les femmes attendaient 1 heure dans les maternités avant de regagner leurs domiciles afin d'observer d'éventuels vomissements.

En cas de vomissement avant 30 minutes une nouvelle dose était administrée et en cas de nouveaux vomissements dans les 30 minutes la participante était exclue de l'étude.

Bras TPI non contrôlé avec la Sulfadoxine + Pyriméthamine

Dans ce bras la dose de la SP était remise aux participantes et il leur était demandé de la prendre une fois à domicile avec consigne stricte de prendre contact avec l'équipe de recherche en cas de vomissements dans les 30 minutes afin de la renouveler. L'administration de la SP s'est faite donc sans observation directe par l'équipe de recherche.

Il était demandé aux deux groupes de participantes de se rendre immédiatement dans les sites d'étude en cas d'effets indésirables graves. Un membre de l'équipe rentrait en contact avec chaque participante ou se rendait au domicile le cas échéant 48 heures après l'administration pour s'assurer de la sécurité et de la tolérance du médicament.

Toutes les participantes ont reçu à l'inclusion une moustiquaire imprégnée d'insecticide à longue durée d'action. Ces MII devraient être utilisées durant toute la grossesse.

I.2.4. Suivi des participantes

Toutes les femmes incluses ont été revues la semaine suivant l'administration du médicament à la recherche d'éventuels effets secondaires et au cours des autres CPN planifiées. Des rendez-vous mensuels ont été planifiés jusqu'à l'accouchement et il était demandé aux femmes de revenir dans les différentes maternités en cas de fièvre ou tout autre malaise.

Chaque parturiente bénéficiait au cours de chaque CPN d'un interrogatoire minutieux, d'un examen clinique et gynéco-obstétrique complet.

Le cahier d'observation était complété et une goutte épaisse et un frottis sanguin étaient réalisés. En cas de positivité de la goutte épaisse, un prélèvement veineux de 5 ml sur tube EDTA était effectué et les parturientes étaient traitées avec de la quinine selon les directives nationales.

Les prélèvements étaient conservés à 4°C puis acheminés au laboratoire de l'Unité de Paludologie de l'IPCI dans les 24 heures.

A l'accouchement, des examens clinique et gynéco-obstétriques étaient conduits avant et après la délivrance. Les constantes notamment la tension artérielle, la température et le pouls étaient notés ainsi que les résultats de l'examen physique dans le cahier d'observation.

A la délivrance, l'enfant était examiné à la recherche de malformations ou toute autre anomalie. Le poids, l'Apgar, la taille, le sexe, le périmètre brachial étaient notés. Le placenta était également examiné et pesé avant tout prélèvement.

Les sangs placentaire, du cordon et veineux maternel ont été recueillis dans des tubes EDTA. Si la participante se rendait immédiatement au site de l'étude après avoir accouché à domicile ou au cours du transfert au site de l'étude cette dernière était examinée et les différentes variables étaient recueillies.

Si cette arrivée sur le site de l'étude se faisait après plus de 24 heures les informations sur l'accouchement, l'enfant et la mère étaient recueillies à partir du carnet de santé de la mère et de l'enfant. Dans ce cas le taux d'hémoglobine maternelle, l'apposition placentaire, l'infection palustre placentaire, le paludisme maternel et le paludisme congénital ne pouvaient pas être recherchés.

I.2.5. Procédures de Laboratoire

Des frottis et gouttes épaisses de sang veineux maternel, de sang de cordon et de sang placentaire ont été réalisés pour déterminer les parasitémies et l'espèce plasmodiale en cause. Un TDR (ICT malaria) a été réalisé sur le sang placentaire. Une centrifugation du reste des échantillons a été faite pour disposer des culots de globules rouges parasités et de plasma veineux maternel et de cordon pour des études ultérieures de génotypage, de chimiorésistance ou de réponses anticorps.

Chaque femme a bénéficié d'une numération formule sanguine pour déterminer le taux d'hémoglobine (Mythic[®] 22).

Une biopsie placentaire sur la face maternelle à 2 cm de l'insertion du cordon ombilical a été réalisée et a servi à la réalisation de l'apposition placentaire. Elle a été fixée avec du formol neutre puis stockée à 4°C pour son acheminement au laboratoire de l'Unité de Paludologie en vue de sa conservation pour des études ultérieures notamment d'histologie placentaire.

I.2.6. Prise en charge des cas de paludisme et d'anémie

Si lors d'une consultation prénatale, la femme présente une anémie sévère ou un signe de paludisme grave ou compliqué ou toute autre pathologie grave, elle était transférée en urgence vers un établissement de soins appropriés.

Dans les autres cas, en cas de paludisme simple, elle recevait un traitement de Quinine base per os à la dose de 24 mg/kg/j en 3 prises durant 7 jours.

En cas de persistance d'une parasitémie dans le sang périphérique de la mère en fin de grossesse, un traitement par Quinine selon les doses indiquées ci-dessus était administré.

En cas d'anémie modérée (Hb<11g/dl) les participantes recevaient du fer (200mg) et de l'acide folique (0,25 mg) à la posologie d'un comprimé par jour pendant 30 jours.

I.2.7. Critères d'efficacité

Critères majeurs

Le critère majeur principal d'efficacité est la prévalence du petit poids de naissance (< 2 500 g) dans les deux groupes.

Les autres critères majeurs sont les prévalences du paludisme maternel en cours de grossesse et à la délivrance, de l'infection palustre placentaire (présence de formes asexuées de *Plasmodium* dans l'apposition placentaire), de l'anémie maternelle modérée (Hb<11g/dl) et de l'anémie maternelle sévère (Hb<8g/dl).

Critères secondaires

Les critères secondaires sont les prévalences du paludisme congénital, de morts nés, des avortements spontanés et de la prématurité (accouchement avant 37 semaines d'âge gestationnel). Les moyennes de poids de naissance et de l'hémoglobine ont été également prises en compte. Les proportions des participantes fébriles en cours de grossesse et à la délivrance ont été également retenues.

I.2.8. Evaluation de la tolérance du médicament

Evènement indésirable :

Il désigne tout symptôme, signe physique, syndrome ou maladie soit survenant pendant l'étude après avoir été absent avant l'étude soit ayant été présent avant l'étude mais semblant s'aggraver. Ceci est indépendant de la cause suspectée de

l'événement. On évalue sa gravité, sa fréquence, sa durée et la cause est déterminée si possible.

Evènements indésirables graves:

Les évènements indésirables graves sont les évènements considérés comme fatals, c'est-à-dire mettant en danger la vie du patient ou nécessitant une hospitalisation ou une prolongation de celle-ci ou entraînant un handicap par une incapacité persistante ou importante entraînant une anomalie ou une malformation congénitale.

I.2.9. Gestion et Analyses statistiques des données

I.2.9.1. Gestion des données

Les données ont été recueillies dans un cahier d'observation précieusement gardé puis saisies dans un ordinateur. Les informations enregistrées dans le questionnaire ont été prises en compte dans l'analyse des résultats. Le poids du bébé, son indice Apgar, la température axillaire de la mère, le poids du placenta, l'âge des femmes, la durée de la grossesse, la parasitémie, le nombre de grossesses, le taux d'hémoglobine maternelle sont des variables continues. Les valeurs moyennes correspondantes à ces variables dans les groupes de femmes ont été obtenues par analyses statistiques élémentaires. Les variables comme la parité, la présence ou l'absence de marqueurs associés à la résistance sont considérées comme des variables qualitatives.

I.2.9.2. Analyse des données

Pour le critère majeur principal de jugement l'analyse a été faite en Intention de Traiter (ITT), Intention de Traiter Modifiée (MITT) et en Per-Protocol (PP). L'analyse en ITT regroupe toutes les participantes ayant reçu au moins une dose de SP et l'analyse en MITT comprend les participantes ayant accouché hors des sites d'étude et dont le poids de naissance a été collecté et les participantes ayant

accouché sur les sites d'étude. Cette analyse exclut donc les perdues de vue dont le poids de naissance n'a pas été collecté. L'analyse en PP prend en compte les données des femmes suivies dans les sites d'étude et qui ont accouché effectivement dans les dits sites. On exclut donc de cette analyse les perdues de vue et les participantes ayant accouché à domicile et dont le poids de l'enfant a été collecté.

Pour les autres critères de jugement, l'analyse a été faite en ITT et PP et les données des mort-nés et des avortements spontanés ont été prises en compte.

La comparabilité des deux groupes a été effectuée par le test de Student pour les variables continues et par le test du Chi² pour les variables discrètes avec correction de Yates en cas d'effectif inférieur à 5. Si les conditions d'application n'étaient pas respectées, les comparaisons ont été effectuées par le test non paramétrique de Mann-Whitney ou par le test de Fisher. La différence entre les deux groupes était jugée statistiquement significative en cas de $p < 0,05$.

I.2.10. Considérations éthiques et réglementaires

I.2.10.1. Bonnes pratiques cliniques et de laboratoire

L'étude a été réalisée selon les principes de la déclaration d'Helsinki concernant la recherche médicale sur l'homme (Recommandations Guiding Physicians in Biomedical Research involving human subjects, Helsinki 1964, amendements de Tokyo 1975, Venise 1983, Hong kong 1989, Somerset West 1986, Edinburgh 2000, Washington 2002, Tokyo 2004 et Seoul 2008).

Le protocole d'étude, la fiche d'informations et le formulaire de consentement éclairé ont été approuvés par le Comité National d'Ethique et de Recherche (CNER) avant que les femmes ne soient enrôlées dans cette étude. Toutes les correspondances avec le Comité d'Ethique ont été remplies par le chercheur principal qui était chargé d'informer le Comité d'Ethique sur les changements majeurs pouvant intervenir dans le protocole.

1.2.10.2. Information et Consentement éclairé des participantes

Le chercheur principal s'est assuré que chaque femme a donné son consentement par voie verbale et par écrit (signature datée) après avoir reçu une explication sur la nature de l'étude, ses objectifs, les procédures qu'elle implique, sa durée prévue, ses risques et bénéfices potentiels et toute gêne qu'elle est susceptible de provoquer. Les participantes ont été informées que la participation à l'étude est totalement volontaire, qu'elles pouvaient se retirer de l'étude à tout moment et que le retrait de leur consentement n'affectait pas la prise en charge médicale subséquente ni ses relations avec le personnel médical traitant. Le chercheur principal vérifiait que les femmes ont signé de façon volontaire le consentement avant d'être enrôlées. Un formulaire du consentement signé était remis à chaque femme à l'inclusion.

II. RESULTATS

II.1. Caractéristiques socio-démographiques

Au total 628 femmes enceintes ont été enquêtées dont 438 étaient éligibles. En définitive 420 participantes ont été randomisées dont 212 et 208 respectivement dans les groupes TPI Contrôlé et TPI non Contrôlé.

Les causes d'inéligibilité étaient le refus de participer à l'étude, l'âge gestationnel supérieur à 28 semaines d'aménorrhée, la faible probabilité d'accoucher sur le site de l'étude et les antécédents d'allergies aux sulfamides. Un effectif de 187 et de 184 a reçu les deux doses de SP. Les données de l'accouchement ont été récoltées chez 190 et 188 participantes respectivement dans les groupes TPI contrôlé et non contrôlé. On notait 22 participantes perdues de vue dans le groupe TPI contrôlé contre 20 participantes dans le groupe TPI non contrôlé. Le diagnostic de l'infestation palustre placentaire a été réalisée sur 174 (TPI contrôlé) et 165 placentas (TPI non contrôlé) (Figure 15).

L'âge moyen des participantes était de $25,86 \pm 0,4182$ et $26,14 \pm 0,4107$ ans respectivement dans les groupes TPI non contrôlé et TPI contrôlé. L'âge gestationnel moyen à l'inclusion était de $19,35 \pm 0,3546$ semaines dans le groupe TPI non contrôlé contre $20 \pm 0,3145$ semaines dans le groupe TPI contrôlé. Dans les deux groupes, la majorité des participantes à l'inclusion portaient une grossesse d'âge compris entre 16 et 20 semaines (46,63% *versus* 51,18%). Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les deux groupes concernant l'âge des mères. On notait par contre plus de secondigestes et de secondipares dans le groupe TPI non contrôlé avec une différence significative ($p < 0,05$). Le groupe TPI non contrôlé comprenait plus de participantes ménagères et sans éducation scolaire ($p < 0,05$).

A l'inclusion il était également noté plus de femmes fébriles dans ce groupe ($p = 0,00011$).

Le poids de naissance a été collecté chez 185 (groupe TPI contrôlé) et 181 (TPI non contrôlé) bébés. Les données de 420, 366 et 339 participantes ont été utilisées respectivement pour l'analyse en ITT, MITT et PP (Tableau XII).

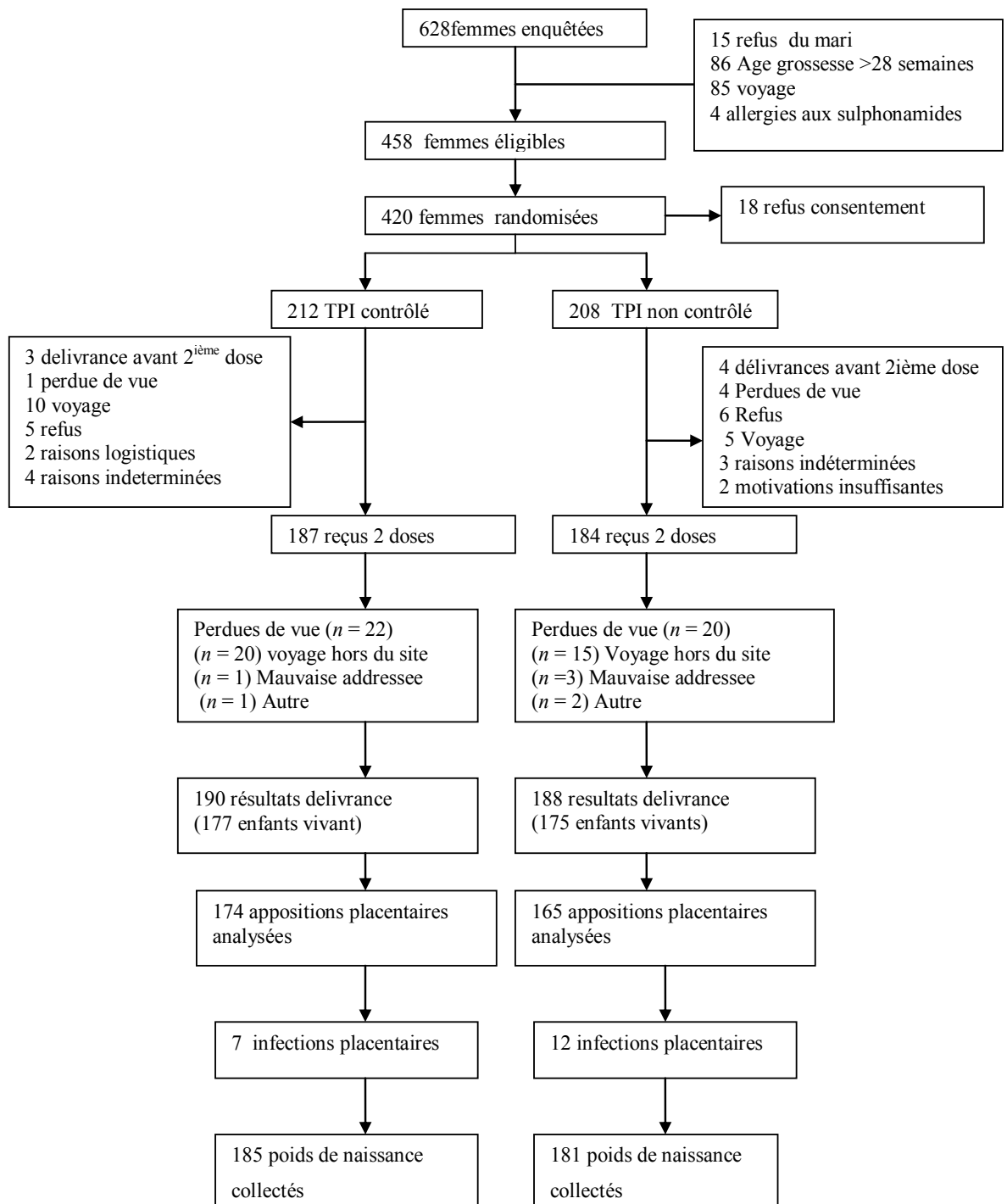


Figure 15: Profil de l'essai clinique

Tableau XII : Caractéristiques socio-démographiques à l'inclusion

Age (ans)	TPI Non Contrôlé (N=208)			TPI Contrôlé (N=212)			p
	n	%	IC95%	n	%	IC95%	
15-19	29	13,9	9 – 19	25	11,8	8 – 16	0,49
20-29	126	60,6	54 – 68	119	56,1	49 – 63	0,32
30-39	50	24	18 – 30	66	31,1	25 – 37	0,11
40-50	3	1,4	0,3 – 2,3	2	1	3 – 2	0,68
Gestité							
Primigestes	43	20,7	15 – 27	57	26,9	21 – 33	0,13
Secondigestes	65	31,3	25 – 37	46	21,7	16 – 28	0,02
Multigestes	100	48,1	41 – 55	109	51,4	44 – 55	0,49
Parité							
Primipares	59	28,4	22 – 34	66	31,1	25 – 37	0,53
Secondipares	65	31,3	25 – 37	44	20,8	16 – 26	0,014
Multipares	84	40,4	33 – 47	102	48,1	41 – 55	0,11
Age gestationnel (Semaines)							
9-15	44	21,2	15 – 27	28	13,2	8 – 18	0,032
16-20	97	46,6	40 – 54	108	51,2	44 – 58	0,35
21-25	48	23,1	17 – 29	60	28,4	22 – 34	0,21
26-30	19	9,1	51 – 29	16	7,58	4 – 12	0,56
Education							
Non	129	62	55 – 69	88	41,5	34 – 48	<0,0001
Primaire	57	27,4	21 – 33	56	26,4	20 – 32	0,82
Secondaire	15	7,1	4 – 10	41	19,3	14 – 24	0,0002
Université	7	3,4	0 – 5	27	12,7	8 – 18	0,0004
Profession							
Ménagères	128	61,5	54 – 68	108	50,9	44 – 58	0,028
Commerçantes	55	26,4	20 – 32	56	26,4	20 – 32	1
Elèves	4	1,9	0 – 4	10	4,7	2 – 8	0,18
Couturières	6	2,9	1 – 5	17	8	4 – 12	0,02
Enseignantes	4	1,9	0 – 4	1	0,5	0 – 1	0,021
Etudiantes	5	2,4	0 – 4	12	5,7	3 – 9	0,09
Coiffeuses	1	0,5	0 – 1	4	1,9	0 – 4	0,37
Autres	5	2,4	0 – 4	4	1,9	0 – 4	0,74
Fièvre	40	19,2	14 – 24	14	6,6	4 – 10	0,00011
Parasitémie	20	9,6	6 – 14	18	8,5	4 – 12	0,689

II.2. Efficacité du TPI non contrôlé *versus* TPI contrôlé selon le critère majeur principal

Au total 366 poids de naissance ont été collectés (poids des morts nés inclus).

Le poids moyen était de $2898,13 \pm 37,39$ g et $2967 \pm 33,52$ g dans les groupes TPI non contrôlé et TPI contrôlé respectivement (MITT). Il n'existait pas de différence statistiquement significative entre les deux groupes ($p > 0,05$).

Le poids moyen de naissance était de $2894 \pm 38,15$ g (TPI non contrôlé) et $2966,70 \pm 35,47$ g (TPI contrôlé) dans la population en PP. La distribution du poids de naissance dans les deux groupes était homogène. Il n'existait donc pas de différence entre les groupes sur le poids de naissance que ce soit en analyse ITT, MITT et PP (Figure 16).

On notait en prenant en compte l'ensemble des participantes, plus de participantes ayant donné naissance à des enfants de petit poids de naissance dans le groupe TPI non contrôlé mais cette différence était non significative ($p > 0,05$). Quelque soit la gestité, on n'observait pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les deux groupes au regard de la prévalence du PPN (Tableau XIII).

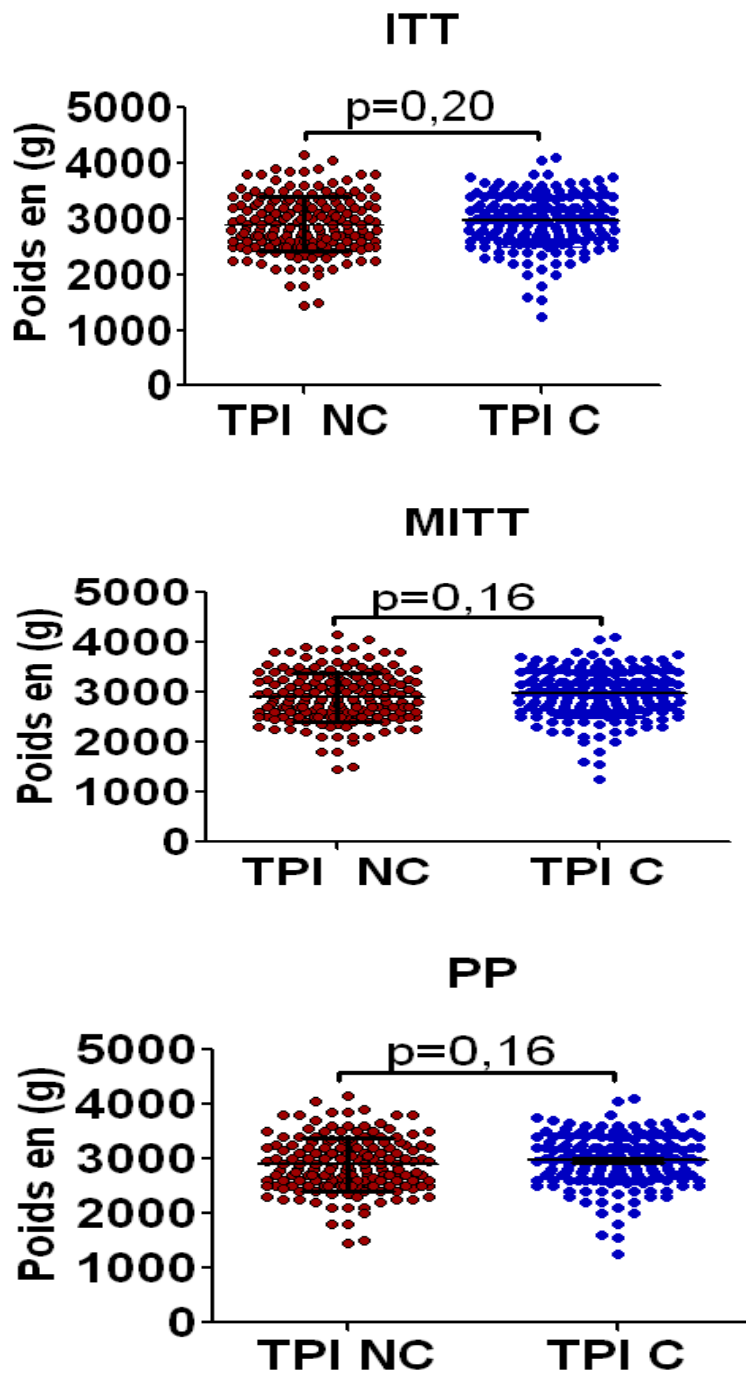


Figure 16 : Distribution du poids de naissance à l'accouchement dans les deux groupes.

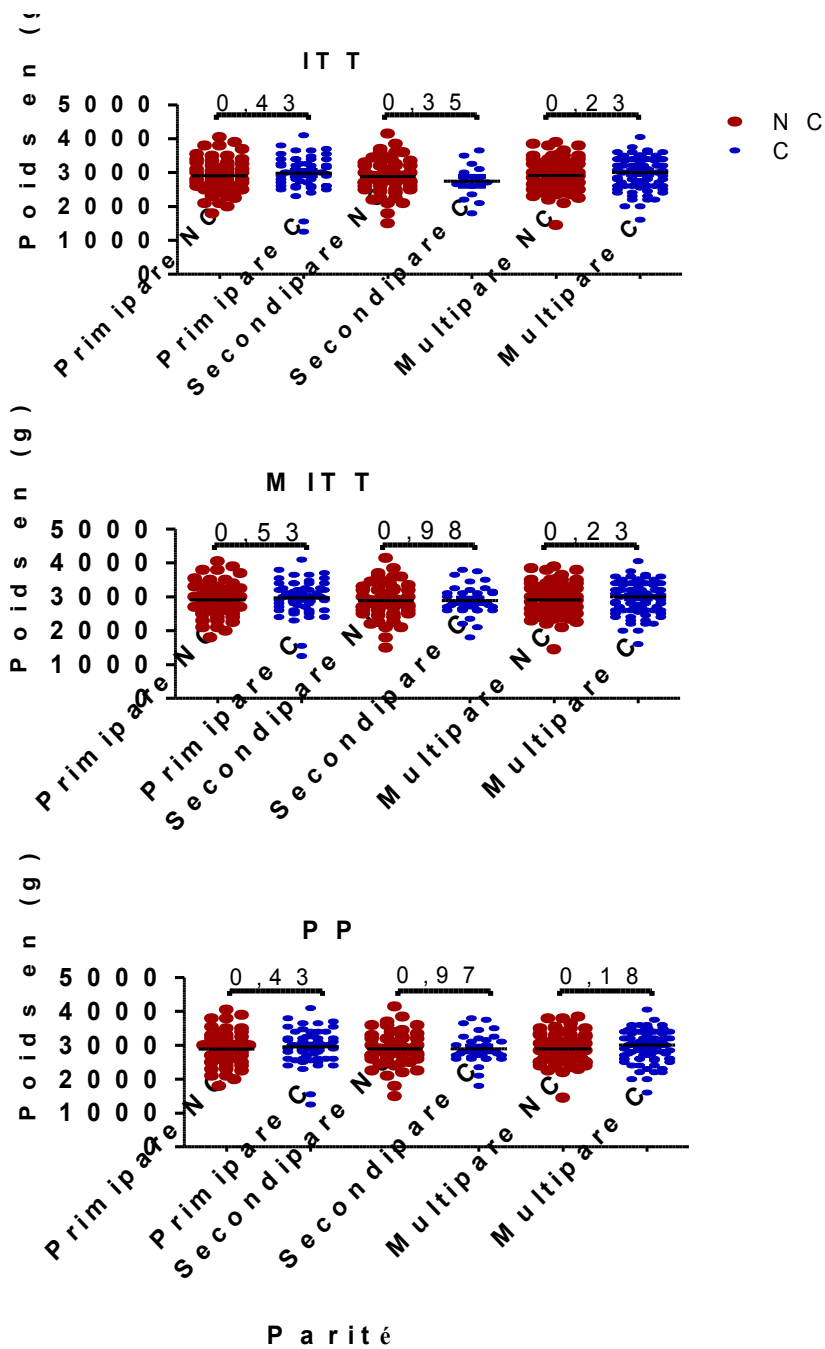


Figure 17 : Distribution du poids de naissance à l'accouchement dans les deux groupes selon la parité.

NC : Non Contrôlé C : Contrôlé

Quelque soit la parité et le type d'analyse aucune différence statistiquement significative n'a pas été observée dans les deux groupes au regard du poids de naissance.

Tableau XIII : Proportion des femmes ayant accouché d'un enfant de Petit Poids de Naissance (<2500g) selon la gestité

Participant	TPI Non Contrôlé			TPI Contrôlé			p
	Effectif	%	IC 95%	Effectif	%	IC 95%	
Toutes							
ITT	55/208	26,4	20 – 32	49/212	23,1	17 – 29	0,43
ITT Modifié	28/181	15,5	10 – 20	22/185	11,9	7 – 17	0,31
PP	26/165	15,8	10 – 21	20/174	11,5	6 – 16	0,25
Primigeste							
ITT	8/43	18,6	7 – 31	13/57	22,8	12 – 34	0,61
ITT Modifié	6/41	14,6	4 – 26	6/50	12	3 – 21	0,70
PP	6/39	15,4	4 – 26	6/49	12,2	3 – 21	0,67
Secondigeste							
ITT	20/65	30,8	20 – 42	10/46	21,7	10 – 34	0,29
ITT Modifié	10/55	18,2	8 – 28	3/39	7,7	–	0,22
PP	9/51	17,7	7 – 29	2/35	5,7	–	0,18
Multigeste							
ITT	27/100	27	18 – 36	26/109	23,9	17 – 31	0,60
ITT Modifié	12/85	14,1	7 – 21	13/96	13,5	7 – 21	0,92
PP	11/75	14,7	7 – 23	12/90	13,3	6 – 20	0,81

Globalement on notait moins de PPN dans le groupe TPI contrôlé en particulier chez les secondigestes et les multigestes.

Tableau XIV : Proportion des femmes ayant accouché d'un enfant de PPN (<2500g) selon la parité

Participant	TPI Non Contrôlé			TPI Contrôlé			p
	Effectif	%	IC95%	Effectif	%	IC95%	
Primipare							
ITT	14/59	23,7	13 – 35	14/68	20,6	11 – 31	0,67
ITT Modifié	9/54	16,7	7 – 27	6/54	11,1	3 – 19	0,38
PP	9/51	17,6	7 – 28	6/57	10,5	3 – 19	0,29
Secondipare							
ITT	20/65	30,8	20 – 42	10/42	23,8	11 – 37	0,43
ITT Modifié	9/54	16,7	7 – 27	4/36	11,1	1 – 21	0,55
PP	8/51	15,7	6 – 26	3/33	9,1	–	0,51
Multipare							
ITT	21/84	25	16 – 34	25/102	24,5	17 – 33	0,92
ITT Modifié	10/72	13,8	6 – 22	12/89	13,5	7 – 21	0,92
PP	9/63	14,3	5 – 23	11/84	13,1	6 – 20	0,84

La prévalence du PPN ne variait pas significativement dans les deux groupes: Toute fois plus de cas de PPN selon la parité ont été observés dans le groupe TPI non contrôlé.

II.3. Efficacité du TPI non contrôlé versus TPI contrôlé selon les autres critères de jugement

La moyenne du taux d'hémoglobine était de $9,87 \pm 0,1419$ et $10,22 \pm 0,1301$ g/dl respectivement dans les groupes TPI non contrôlé et TPI contrôlé ($p > 0,05$). La distribution du taux d'hémoglobine était homogène dans les deux groupes quelque soit le type d'analyse (Figure 18).

On ne notait pas de différence significative ($p > 0,05$) du taux moyen d'hémoglobine dans les deux groupes quelque soit la parité et le type d'analyse (ITT, MITT, PP) (Figure 19).

L'infestation palustre placentaire a été mise en évidence chez 7,3% et 4 % des femmes respectivement dans les groupes TPI non contrôlé et Contrôlé en analyse PP avec une différence non significative ($p > 0,05$). Au total 50,9% et 46 % de participantes ont présenté une anémie modérée à l'accouchement dans les groupes TPI non contrôlé et TPI contrôlé respectivement. Quant à la prévalence de l'anémie sévère, elle était de 14,6% (TPI non contrôlé) et 9,8% (TPI contrôlé). Quelque soit le type d'anémie et la gestité, aucune différence statistiquement significative n'était observée dans les deux groupes (Tableau XV).

On notait plus de participantes fébriles à l'inclusion (19,2% vs 6,6%), au cours de la grossesse (12% vs 8%) et à l'accouchement (12,5% vs 9,6%) dans le groupe TPI non contrôlé avec seulement une différence significative entre les deux groupes à l'inclusion ($p < 0,05$).

L'incidence de la parasitémie était plus élevée dans le groupe TPI non contrôlé à l'inclusion (9,6% vs 8,5%), au cours de la grossesse (8,7% vs 5,2%) et à l'accouchement (4,2% vs 2,9%) mais la différence était statistiquement non significative ($p > 0,05$). Au regard de l'anémie, aucune différence significative n'était observée dans les deux groupes quelle que soit la parité (Tableau XVI).

Les prévalences de prématurité, d'avortement spontané et de morts nés étaient de 3%, 4,2%, 3,6% et 4,6%, 2,9%, 4,6% respectivement dans les groupes TPI non contrôlé et TPI contrôlé (analyse PP) avec des différences non statistiquement significatives (Tableau XVII).

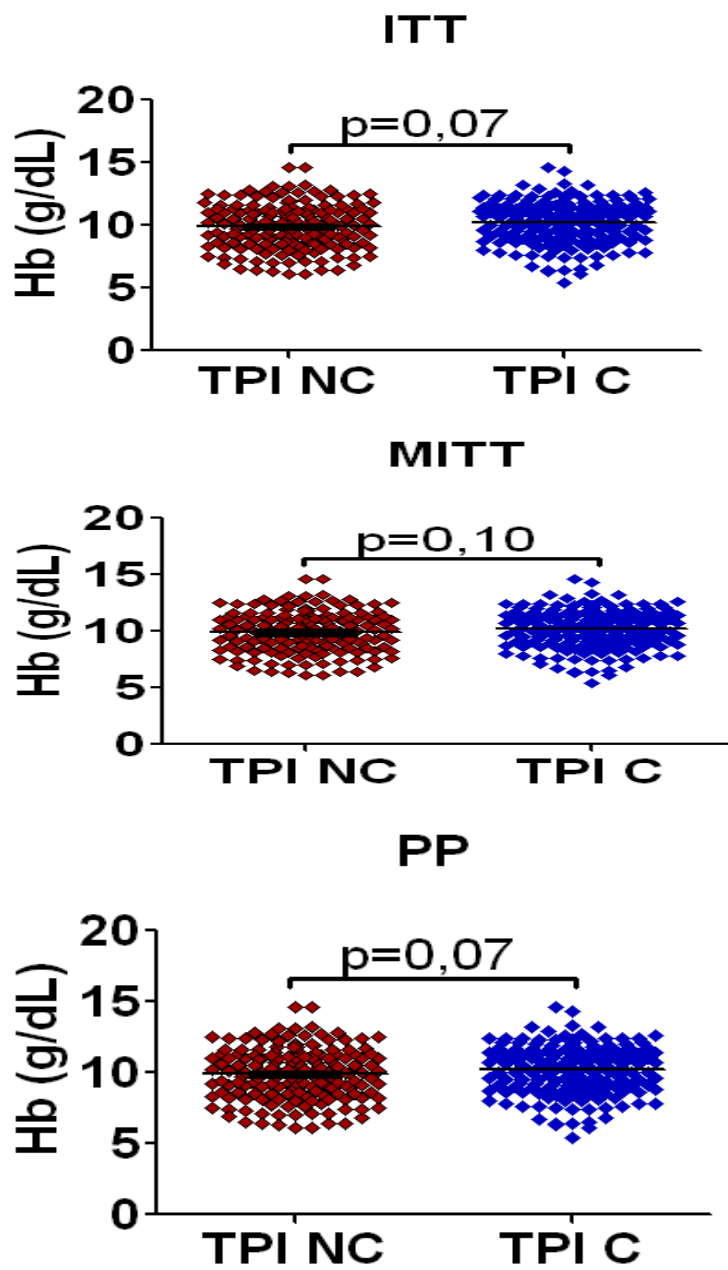


Figure 18 : Distribution de l'hémoglobine dans les deux groupes

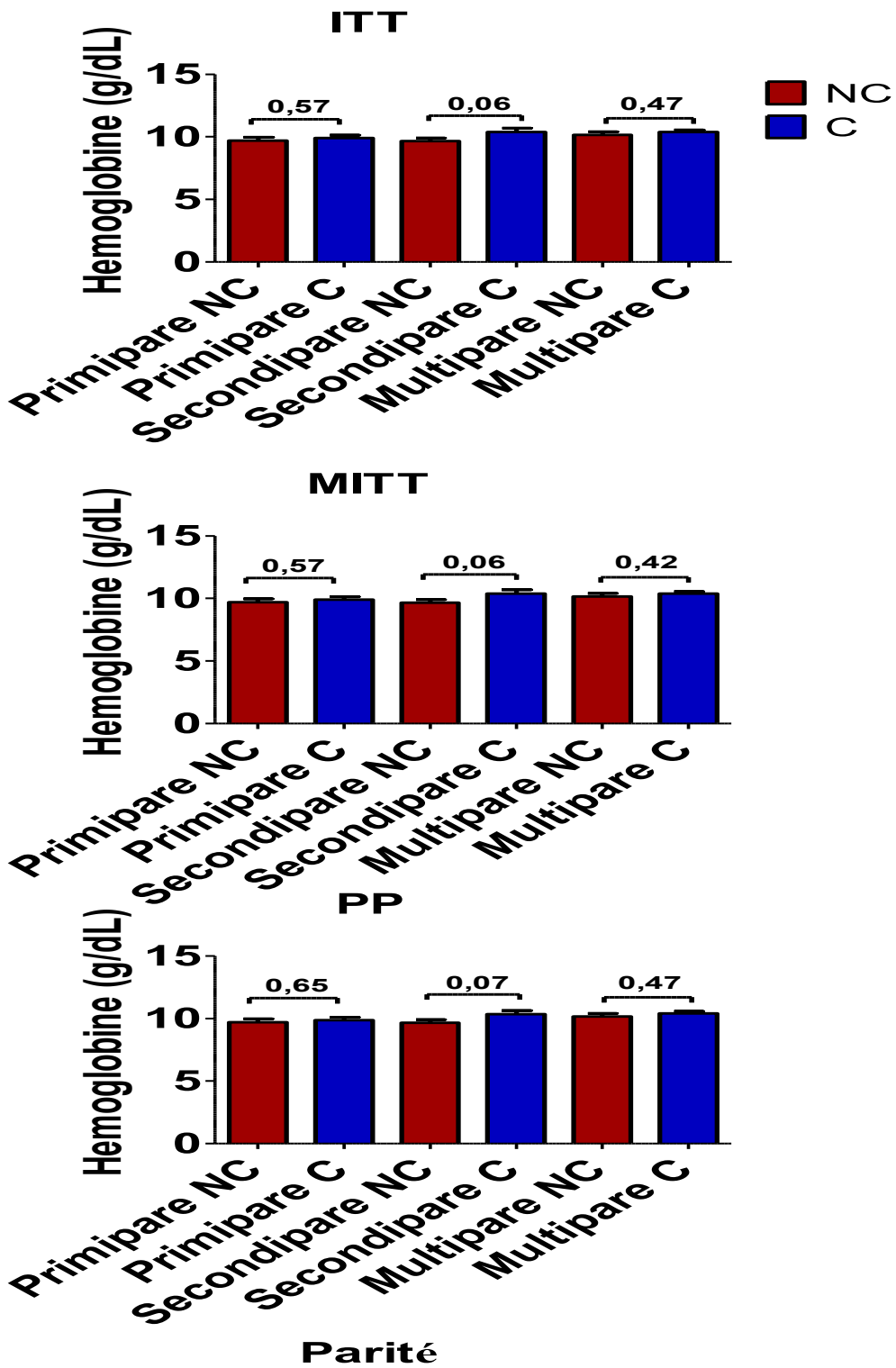


Figure 19 : Distribution de l'hémoglobine dans les deux groupes selon la parité

Tableau XV : Prévalence de l'infestation palustre placentaire et de l'anémie selon la gestité dans les deux groupes

Critères de jugement	TPI Non Contrôlé			TPI Contrôlé			P
	Effectif	%	IC 95%	Effectif	%	IC 95%	
Infestation Placentaire^a							
ITT	55/208	26,4	20 – 32	45/212	21,2	16 – 26	0,21
PP	12/165	7,3	3 – 11	7/174	4	1 – 7	0,19
Anémie modérée^b							
Primigeste	21/39	53,9	38 – 70	23/49	46,9	33 – 61	0,52
Secondigeste	27/51	52,9	39 – 67	17/35	48,6	32 – 66	0,69
Multigeste	36/75	48	37 – 59	40/90	44,4	34 - 54	0,65
Total	84/165	50,9	43 – 59	80/174	46	39 – 53	0,37
Anémie sévère^c							
Primigeste	9/39	23,1	10 – 36	6/49	12,2	3 – 21	0,18
Secondigeste	7/51	13,7	4 – 24	2/35	5,7	–	0,30
Multigeste	8/75	10,7	4 – 18	9/90	10	4 – 16	0,89
Total	24/165	14,6	10 – 20	17/174	9,8	6 – 14	0,18

^a Présence de formes asexuées de *Plasmodium*, ^b Hb <11 g/dL, ^c Hb <8 g/dL.

Tableau XVI : Incidence de la fièvre, de la parasitémie et de l'anémie selon la parité dans les deux groupes

Critères de jugement	TPI non contrôlé			TPI contrôlé			p
	Efficif	%	IC 95%	Efficif	%	IC 95%	
Fièvre (T°C ≥ 37,5)							
Au cours de la grossesse	25/208	12	8 – 16	17/212	8	4 – 12	0,17
A l'accouchement	24/192	12,5	8 – 18	18/188	9,6	6 – 14	0,36
Parasitémie^a							
Au cours de la grossesse	18/208	8,7	5 – 13	11/212	5,2	2 – 8	0,16
A l'accouchement	7/165	4,2	1 – 7	5/174	2,9	0,4 – 5	0,49
Anémie modérée^b							
Primipare	26/51	51	37 – 65	29/57	50,9	38 – 64	1
Secondipare	28/52	53,9	40 – 68	13/33	39,4	22 – 56	0,19
Multipare	30/62	48,4	37 – 61	38/84	45,2	34 – 55	0,71
Total	84/165	50,9	43 – 59	80/174	46	9 – 53	0,37
Anémie sévère^c							
Primipare	9/51	17,7	7 – 29	6/57	10,5	3 – 19	0,29
Secondipare	9/52	17,3	7 – 27	3/33	9,1	–	0,35
Multipare	6/62	9,7	3 – 17	8/84	9,5	4 – 16	0,92
Total	24/165	14,6	10 – 20	17/174	9,8	6 – 14	0,18

^a Présence de formes asexuées de *Plasmodium*, ^b Hb <11 g/dL, ^c Hb <8 g/dL.

Tableau XVII : Prévalence du paludisme congénital, de la prématurité, de l'avortement spontané et des morts nés dans les deux groupes

Paramètres	TPI Non Contrôlé		TPI Contrôlé		p		
	Efficatif %	IC 95%	Efficatif %	IC 95%			
Parasitémie sang maternel							
ITT	50/208	24	18 – 30	43/212	20,3	15 – 25	0,35
PP	7/165	4,2	1 – 7	5/174	2,9	0 – 6	0,50
Parasitémie sang cordon							
ITT	43/208	20,7	15 – 27	38/212	17,9	13 – 23	0,47
PP	0/165	0	-	0/174	0	-	1
Prématurité^a							
ITT	26/208	12,5	8 – 18	30/212	14,2	9 – 19	0,62
PP	5/165	3	0 – 7	8/174	4,6	2 – 8	0,45
Avortement spontané^b							
ITT	27/208	13	8 – 18	27/212	12,7	8 – 18	0,92
PP	7/165	4,2	1 – 7	5/174	2,9	0 – 6	0,49
Mort nés^c							
ITT	33/208	15,9	11 – 21	35/212	16,5	12 – 22	0,86
PP	6/165	3,6	1 – 7	8/174	4,6	2 – 8	0,65

^a Age gestationnel <37 semaines d'aménorrhée (Ballard score), ^b Expulsion du fœtus avant 28 semaines de gestation, ^c Accouchement d'un enfant mort né après 28 semaines de gestation

II.4. Sécurité et tolérance de la SP dans les deux groupes

Au total 21,63% et 23,58% des participantes ont présenté des effets secondaires indésirables modérés dont les plus fréquents dans les deux groupes étaient les nausées, les vomissements, l'asthénie et les céphalées. Aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence ($p > 0,05$). Dans les groupes TPI non contrôlé et TPI contrôlé respectivement 2,88% et 2,33% des participantes ont refusé de prendre la seconde dose de SP en raison des effets secondaires (Figure 20).

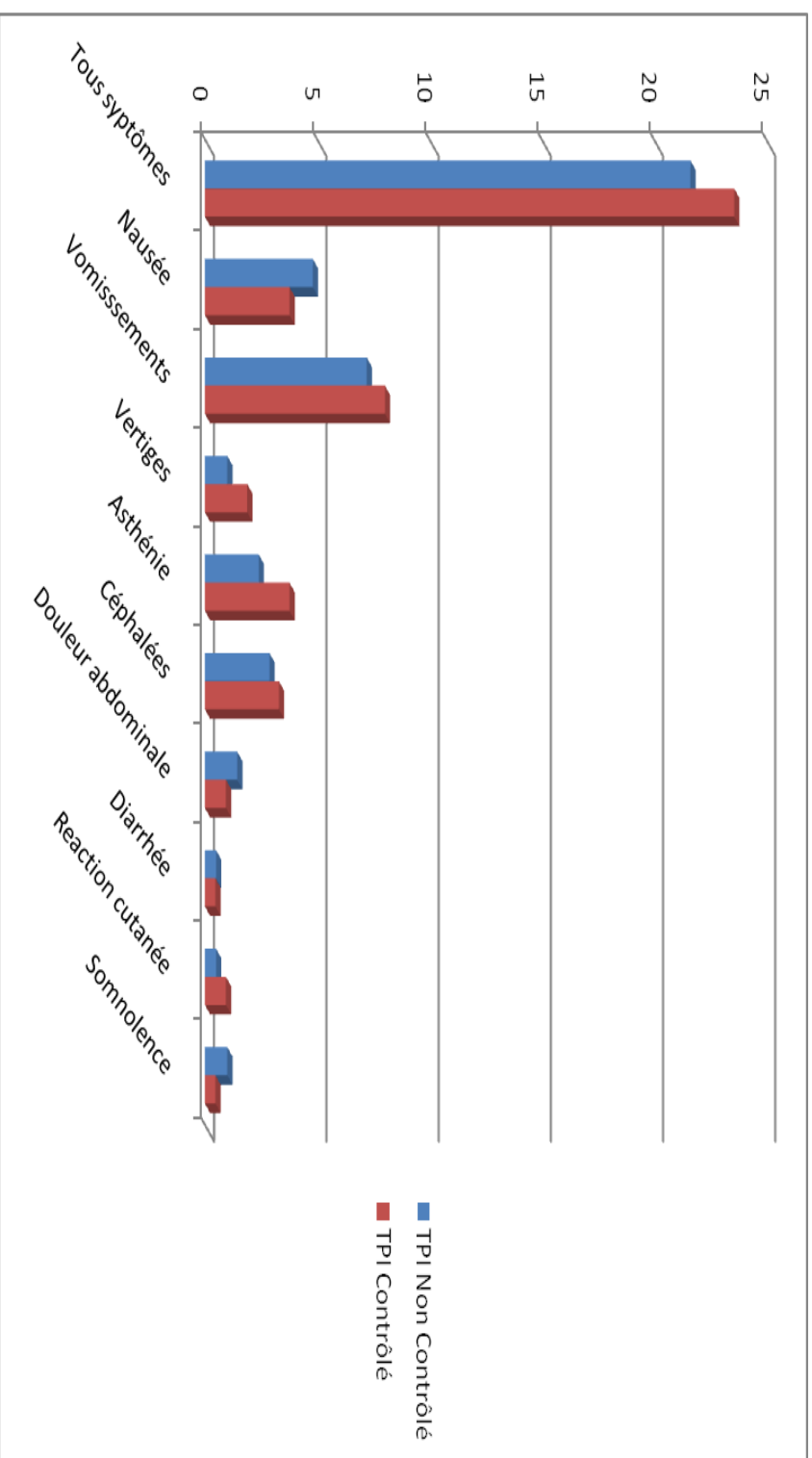


Figure 20 : Répartition des effets secondaires indésirables dans les deux groupes

III. DISCUSSION

Aujourd'hui, l'OMS recommande dans le cadre du contrôle du paludisme chez la femme enceinte un paquet d'interventions incluant le traitement préventif intermittent, les moustiquaires imprégnées d'insecticides, la prise en charge correcte des cas de paludisme, le diagnostic et le traitement de l'anémie dans les pays d'endémie palustre (WHO, 2010).

De nombreux essais cliniques ont démontré l'impact positif du TPI avec la sulfadoxine-pyriméthamine ou d'autres antipaludiques efficaces comme la méfloquine sur l'infection palustre placentaire, l'anémie maternelle et le petit poids de naissance (Briand *et al.*, 2009 ; Gies *et al.*, 2009, Bouyou-Akotet *et al.*, 2010b).

Depuis quelques années, le TPI avec la SP est devenue la pierre angulaire de la prévention du paludisme chez la femme enceinte vivant dans les zones de transmission stable. Néanmoins une controverse récente a soulevé des questions sur le TPI. Cette stratégie est-elle la plus appropriée dans la prévention du paludisme chez la femme enceinte en Afrique en raison de la résistance élevée de *P. falciparum* à la SP dans certaines régions (Ter Khuile *et al.*, 2007b ; Briand *et al.*, 2009).

Dans la précédente étude conduite simultanément avec celle-ci, la prévalence des parasites mutants purs *dhfr* et *dhps* était respectivement de 51,13% et 70,2% à Anonkoua-kouté. A Samo les fréquences des mutations *pfdhps* Gly-581 et Gly-437 étaient respectivement de 100% et 73% tandis que la mutation principale *pfdhfr* Asn-108 était retrouvée chez 45,2 % des isolats.

L'hypothèse testée dans cette étude était que malgré une prévalence élevée des gènes de résistance à la SP, *dhfr* et *dhps*, à Anonkoua-kouté et à Samo, le médicament gardait toujours son efficacité dans la protection des femmes semi-immunes enceintes contre le faible poids de naissance et les autres effets néfastes du paludisme.

Dans notre travail le poids de naissance a été retenu comme critère majeur principal de jugement de l'efficacité du TPI car il est un bon indicateur de santé publique des conséquences du paludisme au cours de la grossesse et plusieurs études ont montré la corrélation entre poids de naissance et efficacité du TPI (Sarr *et al.*, 2006, Briand *et al.*, 2009 ; Tiono *et al.*, 2009). Dans ce contexte de résistance de *P. falciparum* à la SP notre étude a démontré une efficacité équivalente ($p>0,05$) du TPI par la SP dans les deux groupes de participantes.

Une méta-analyse conduite par Ter kuile en 2007 a confirmé que les deux doses de SP en TPI gardaient une efficacité en réduisant l'infestation palustre placentaire et le faible poids de naissance dans les régions où on notait 19 à 26% de résistance *in vivo* de *P. falciparum* chez les enfants.

Cette étude a également démontré que la SP en TPI continuait à être bénéfique à la femme enceinte en terme de réduction de la parasitémie maternelle à la délivrance dans les zones avec des taux de résistance *in vivo* de plus de 39% à la SP à J14 chez les enfants de moins de 5 ans.

Dans le sud du Bénin où la résistance *in vivo* à la SP atteint 72% chez les enfants de moins de 5 ans, la SP était toujours capable de réduire le taux de faible poids de naissance de 40% et celui de l'infestation palustre placentaire de 75% comparée à la chloroquine en prophylaxie évaluée l'année précédente (Briand *et al.*, 2008). Des résultats similaires ont été obtenus en Afrique de l'Ouest (Aziken *et al.*, 2011 ; Bertin *et al.*, 2011 ; Huynh *et al.*, 2011 ; Wilson *et al.*, 2011).

En Tanzanie par contre une étude réalisée dans une région de résistance élevée à la SP n'a montré aucun bénéfice clinique du TPI avec la SP (Harrington *et al.*, 2009).

Cependant il faut noter que le petit poids de naissance peut être également causé par d'autres pathologies développées par la mère au cours de la grossesse notamment les infections bactériennes, virales et parasitaires. Ici dans notre étude le suivi médical régulier dont ont bénéficié nos participantes ne nous a pas permis de mettre en évidence ces pathologies au cours de la grossesse.

En Afrique subsaharienne, 20% des petits poids de naissance sont attribuables au paludisme gestationnel (Desai *et al.*, 2007).

L'anémie maternelle a également été proposée comme indicateur pour évaluer le contrôle du paludisme en Afrique en se basant sur un risque plus élevé de l'anémie maternelle chez les primigestes comparé à celui des multigestes (Savage *et al.*, 2007).

Aucune différence significative n'a été observée dans les deux groupes au regard de l'anémie maternelle quelque soit la gravité, de l'infestation palustre placentaire, du paludisme en cours de grossesse et à la délivrance.

Cependant le groupe contrôlé était associé à une réduction modérée de l'incidence biologique des paramètres ci-dessus par rapport au groupe non contrôlé.

L'anémie développée par nos participantes ne peut pas être attribuée uniquement au paludisme. En effet l'anémie maternelle à l'accouchement peut être multifactorielle. Ainsi les défaillances nutritionnelles et certaines pathologies autres que le paludisme peuvent expliquer l'anémie maternelle à terme. En Afrique 5-10% des femmes enceintes développeraient une anémie sévère dont 26 % sont attribuées au paludisme (Desai *et al.*, 2007).

L'absence de différence entre les deux groupes pourrait s'expliquer par le fait que la SP était fournie gratuitement aux femmes enceintes dans le groupe TPI non contrôlé avec recommandation stricte de prendre le médicament à la maison.

Il a été démontré que, les interventions les plus efficaces faites dans des conditions strictes d'étude sont rarement applicables dans les conditions de mise en œuvre sur le terrain. Il existe de nombreux facteurs pouvant influencer la mise en œuvre de telles interventions notamment la complexité de ces interventions, la capacité du système de santé à les appliquer et l'acceptabilité de ces interventions par le personnel de santé et les bénéficiaires.

Durant l'étude, la SP n'était pas toujours disponible dans les pharmacies des sites d'étude ainsi que des récipients propres et de l'eau potable pour administrer la SP. Les femmes devraient se procurer la SP dans les pharmacies privées et prendre le médicament à la maison. La disponibilité de la SP dans les structures sanitaires est un facteur important pour améliorer le TPI et implémenter la stratégie DOT (Akinleye *et al.*, 2009, Mubyazi *et al.*, 2005).

Des ruptures de stock de la SP dans les pharmacies des sites sont fréquemment rapportées. Les services de qualité dans les services de CPN sont nécessaires pour promouvoir une couverture élevée du TPI pour le bien être des mères et de leurs enfants. Autoriser les femmes enceintes à prendre la SP sans supervision directe rend sa compliance incertaine et indetermine même l'essence du TPI.

Il a été démontré que l'infection par le VIH chez la femme enceinte est associée à un risque élevé de petit poids de naissance, de paludisme placentaire et une baisse de l'efficacité du TPI (Filler *et al.*, 2006 ; WHO, 2007). L'infection à VIH pourrait donc être un biais dans l'évaluation de l'efficacité du TPI. Cependant, la prévalence globale de l'infection à VIH dans nos sites d'étude était d'environ 4% au moment de cette étude.

Malgré le fait que les MII ne sont pas d'usage courant dans les zones d'étude, le taux d'utilisation des MII distribuées gratuitement à l'inclusion est resté élevé au cours de l'étude. Cela a pu être vérifié au cours des visites à domicile.

Les MII apparaissent donc comme un facteur déterminant dans l'efficacité du TPI. Ainsi les résultats de notre étude ne peuvent être seulement attribués à la SP, mais à l'action conjuguée de la SP en TPI et des MII.

Une étude conduite à l'ouest du Kenya portant à la fois sur le TPI avec la SP et les MII a montré que les deux stratégies étaient efficaces dans la prévention de l'anémie maternelle chez les primigestes et les secondigestes. Le TPI avec la SP s'est avéré légèrement plus efficace que la moustiquaire surtout chez les secondigestes. Un effet additionnel a été obtenu lorsque les deux stratégies étaient combinées (Njagi *et al.*, 2003).

D'autres travaux ont également démontré cet effet additionnel lorsque les deux stratégies de prévention du paludisme chez la femme enceinte sont simultanément utilisées (Guyatt *et al.*, 2004, Kabanywany *et al.*, 2008 ; Feng *et al.*, 2010).

Il est fort probable que si les MII sont utilisées de façon régulière et effective, le TPI avec la SP peut ne pas être préconisée chez certaines femmes enceintes notamment les multipares (Menendez *et al.*, 2008).

Ainsi les Programmes Nationaux de Lutte contre le paludisme peuvent privilégier la distribution des moustiquaires en particulier celles imprégnées d'insecticides à longue durée d'action au cours des CPN, comme première stratégie pour la prévention du paludisme chez la femme enceinte. La stratégie du TPI avec la SP serait dès lors réservée aux primigestes et secondigestes ainsi qu'aux femmes résidant dans les régions à forte prévalence VIH.

La SP est généralement considérée comme un médicament sans danger lorsqu'il est utilisé en TPI. Cependant il peut causer de façon rare de graves réactions cutanées et hématologiques (Peters *et al.*, 2007).

Aucun effet secondaire grave attribuable au médicament n'a été rapporté dans nos travaux. La proportion de femmes ayant rapporté des effets secondaires était respectivement de 23,58% et 21,63% dans les groupes TPI Contrôlé et non contrôlé respectivement. Les vomissements ont été l'effet secondaire le plus observé chez les participantes.

Bien qu'il apparaisse de plus en plus que la SP pourrait être remplacée par un autre antipaludique plus efficace en TPI, il n'est pas bien établi quand ce changement interviendra.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Ter Kuile *et al.* (2007b) qui ont montré que le TPI avec la SP pourrait être toujours préconisé dans les régions où existent des résistances de *P. falciparum* à la SP.

Cependant un autre facteur et non des moindres pourrait contribuer à l'efficacité du TPI dans les zones de forte résistance de *P. falciparum* à la SP. Il s'agit du

taux de couverture des CTA dans la population. En effet l'utilisation des CTA entraîne une réduction de la transmission du paludisme dans une région donnée à cause de l'effet gamétocitocyste de ces combinaisons. Toutefois aucune donnée n'est disponible sur le taux de couverture de ces CTA dans nos zones d'étude. Il serait judicieux d'en déterminer le taux de couverture dans l'avenir.

Aujourd'hui l'OMS recommande le génotypage des gènes *dhfr* et *dhps* de *P. falciparum*, méthode couramment utilisée en épidémiologie moléculaire, pour évaluer l'efficacité de la SP. Les marqueurs moléculaires sont utiles pour déterminer l'émergence et l'expansion de la résistance médicamenteuse dans les régions de résistance faible ou modérée.

L'OMS a récemment indiqué que les données issues des études *in vivo* de la SP chez les enfants de moins de 5 ans ne pourraient être un indicateur fiable de l'efficacité du TPI chez la femme enceinte (WHO, 2007).

L'immunité antipalustre et les spécificités pharmacocinétiques sont autant de facteurs qui pourraient expliquer le fait que les données *in vivo* obtenues chez les enfants ne peuvent pas être extrapolées aux femmes enceintes (Kalanda *et al.*, 2006, Tagbor *et al.*, 2007).

L'efficacité thérapeutique de la sulfadoxine-pyriméthamine chez les enfants atteints de paludisme à *P. falciparum* sous-estime grandement l'efficacité de cette dernière en TPI. En effet l'efficacité de la SP en TPI semble dépendre de l'immunité antérieure acquise par la femme enceinte. En outre, les primipares, qui sont les plus vulnérables aux effets délétères du paludisme gestationnel, sont aussi les moins protégées chez les femmes enceintes qui reçoivent la sulfadoxine-pyriméthamine dans les zones où la résistance à la SP est en augmentation (Tagbor *et al.*, 2007).

En Tanzanie, 28 jours après le traitement à la sulfadoxine-pyriméthamine, le taux d'échec thérapeutique était de 16% chez les femmes enceintes et 80% chez les enfants âgés de moins de 5 ans deux années plus tôt (Mutabingwa *et al.*, 2009).

De nombreux pays ont adopté le TPI chez la femme enceinte sous l'impulsion de l'OMS. Malheureusement son implémentation sur le terrain se heurte encore aujourd'hui à de nombreux obstacles liés notamment au système sanitaire et aux perceptions individuelles. Les obstacles liés au système de santé incluent l'absence de la SP dans les structures sanitaires, la formation insuffisante du personnel de santé impliqué dans les CPN, le faible taux de fréquentation des CPN ou la consultation tardive pour les premières CPN.

Les données sur la santé maternelle et l'issue de la grossesse dans les régions d'endémie palustre sont importantes en santé publique pour évaluer les interventions en termes de traitement et de prévention du paludisme chez la femme enceinte. Aussi l'analyse et l'interprétation des données au plan local peuvent-elles non seulement permettre de renforcer les capacités du personnel médical mais également être source de motivation. Nos résultats pourraient aider les autorités sanitaires et le PNLP à prendre des décisions concernant le traitement et la prévention du paludisme chez la femme enceinte. Actuellement cette étude apporte des informations recherchées par les décideurs afin de déterminer l'intérêt de la SP en TPI dans le contexte de la résistance de *P. falciparum* à ce médicament. Toutefois avec des niveaux de forte résistance à la SP observés dans certaines régions, cette molécule risque d'être compromise très bientôt dans le TPI chez la femme enceinte. Il existe par conséquent un besoin urgent d'évaluation de nouvelles molécules pour le TPI chez la femme enceinte.

Des essais cliniques sont en préparation ou mis en œuvre aujourd'hui mais il faudra de nombreuses années avant que les résultats ne soient exploitables et applicables sur le terrain (Luntamo *et al.*, 2010 ; Jansen, 2011 ; Onyamboko *et al.*, 2011). De nouvelles stratégies peuvent également être mises en route face à la résistance à la SP notamment (Tagbor *et al.*, 2007, Tagbor *et al.*, 2010). Ainsi nous encourageons l'utilisation des moustiquaires imprégnées dans le contexte de la résistance de *P. falciparum* à la SP. Le PNLP pourrait mettre à la

disposition des femmes enceintes de façon gratuite les moustiquaires et la SP en quantité suffisante et sans rupture de stocks au cours des CPN (Sangaré *et al.*, 2010).

Des études récentes ont montré que la pression médicamenteuse avec la SP dans une région de forte résistance pourrait sélectionner un nouvel allèle triple mutant du gène *dhps* apportant ainsi une mutation additionnelle au codon 581 (Gesase *et al.*, 2009). L'administration de la SP en TPI pourrait induire donc une augmentation de la prévalence de la résistance à la SP mais celle-ci semble limitée et inconstamment observée (Menendez *et al.*, 2011).

L'efficacité de la SP chez les enfants a décliné de façon vertigineuse ces dernières années entraînant son retrait en traitement curatif dans la plupart des pays d'endémie palustre. C'est à juste titre que des questions sur la longévité de la SP en TPI chez la femme enceinte ont été soulevées. En dépit d'une large utilisation de la SP en TPI, ses mécanismes ne sont pas totalement élucidés. Cependant il semble que l'effet prophylactique opposé à l'effet thérapeutique seul joue un rôle important (WHO, 2006). De plus réserver exclusivement la SP pour le TPI pourrait réduire la pression médicamenteuse et prolonger l'utilisation de ce médicament. Sauf que cela entraîne un risque de maintien de ce médicament peu coûteux dans le commerce avec pour conséquence un risque d'utilisation par la population, à moins de bien former les prescripteurs et les dispensateurs à la prise en charge correcte du paludisme.

Conclusion

Le Traitement Préventif Intermittent (TPI) constitué avec la Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide, les stratégies essentielles de la prévention du paludisme chez la femme enceinte adoptée depuis plusieurs années par les pays d'endémie palustre. L'apparition et l'extension de la résistance de *P. falciparum* à la SP pourraient gravement compromettre l'efficacité de la SP en TPI chez la femme enceinte. La présente étude avait pour but d'évaluer l'efficacité du TPI avec la SP dans deux groupes de femmes enceintes dans deux régions de forte résistance de *P. falciparum* à la SP.

Au total 420 participantes ont été incluses dans l'étude dont 208 et 212 respectivement dans le groupe TPI non contrôlé et TPI contrôlé.

Le critère principal de jugement était la prévalence du petit poids de naissance dans les deux groupes.

A l'issue des travaux la prévalence du petit poids de naissance était plus élevée dans le groupe TPI non contrôlé mais cette différence n'était pas statistiquement significative. Aucune différence significative n'a été observée dans les deux groupes au regard de l'anémie maternelle quelle que soit sa gravité, de l'infection palustre placentaire, du paludisme en cours de grossesse et à la délivrance, de la prématurité, de l'avortement spontané et des morts nés.

Ces résultats montrent que le TPI avec la SP demeure efficace à Anonkouakouté et à Samo malgré la forte résistance de *P. falciparum*. Il faut cependant relativiser cette efficacité en raison de l'utilisation de la Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide chez toutes les participantes et de l'utilisation des CTA dans les deux zones d'étude. L'étude précédente a montré une augmentation constante de résistance de *P. falciparum* à la SP malgré le retrait de cette association en traitement curatif du paludisme simple. Celle-ci s'explique par la pression médicamenteuse exercée sur le parasite. Il est donc urgent de réserver l'utilisation de cette molécule en TPI chez la femme enceinte et éventuellement

chez l'enfant et songer dès à présent à de nouvelles alternatives préventives du paludisme chez la femme enceinte.

Les dérivés de l'artémisinine pourraient constituer une alternative intéressante à la SP. Cependant en cas d'une augmentation et d'une extension rapide de la résistance à ces derniers cette alternative serait déjà compromise. Il est donc nécessaire de faire une évaluation de l'efficacité thérapeutique de ces dérivés en association en vue d'une évaluation éventuelle en TPI chez la femme enceinte.

*Chapitre III : Efficacité thérapeutique et tolérance des associations Artesunate-amodiaquine versus Artéméther-luméfantrine en Côte d'Ivoire au cours du paludisme non compliqué à *P. falciparum**

Introduction

La résistance multiple de *P. falciparum* à la plupart des antipaludiques est un grave problème de santé publique (WHO, 2010). Aujourd'hui les associations Artésunate-amodiaquine (ASAQ) et Artéméther-luméfantrine (AL) sont les CTA les plus disponibles et les plus recommandées dans le traitement du paludisme simple (WHO, 2010). La découverte en 2008 d'une potentielle résistance aujourd'hui confirmée, de *P. falciparum* aux dérivés de l'artémisinine à la frontière thaïlano-Cambodgienne, foyer ancestral d'émergence des résistances a provoqué une onde de choc dans le monde. La résistance de *P. falciparum* aux dérivés de l'artémisinine rend urgente la mise en place de stratégies visant à identifier et à éradiquer les souches résistantes (Noedl *et al.*, 2008 ; Dondorp *et al.* 2009 ; Dondorp *et al.* 2010 ; Enserink, 2010 ; White, 2010; WHO, 2010 ; WHO, 2011). D'autres foyers de résistance aux dérivés de l'artémisinine ont été confirmés au Mekong (WHO, 2012).

Historiquement l'extension de la résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques se fait de l'Asie du Sud'Est à l'Afrique de l'Est et plus tard à l'Afrique de l'Ouest.

La persistance des CTA sous dosées et l'utilisation inappropriée des dérivés de l'artémisinine en monothérapie dans le secteur privé particulièrement en Afrique Sub-Saharienne (où la plupart des malades paient les antipaludiques dans le secteur privé) favorisent la résistance (Legris, 2005 ; Goodman *et al.*, 2007 ; Granado *et al.*, 2009 ; Newton *et al.*, 2010).

L'association Artéméther-luméfantrine (AL) présente une bonne efficacité mais dans les régions à transmission élevée, la relative demi-vie de la luméfantrine serait à l'origine d'une incidence élevée de réinfestations survenant rapidement après le traitement (Kamya *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 ; Dorsey *et al.*, 2007).

Dans de nombreux pays d'endémie palustre, l'augmentation et l'extension de la résistance à la SP pourraient bientôt compromettre l'efficacité de ce médicament en TPI chez la femme enceinte (Vallely *et al.*, 2007 ; Mockenhaupt *et al.*, 2008 ; Harrington *et al.*, 2009).

Des essais cliniques sont actuellement en cours pour évaluer d'autres antipaludiques notamment les dérivés de l'artémisinine qui pourraient être utilisés en TPI chez la femme enceinte en lieu et place de la SP.

Le TPI avec les dérivés de l'artémisinine chez la femme enceinte se présente comme une alternative prometteuse (Onyamboko *et al.*, 2011).

De plus l'OMS recommande l'usage des CTA dans le traitement du paludisme au cours du deuxième et troisième trimestre de grossesse (WHO, 2010). La résistance aux dérivés de l'artémisinine serait donc non seulement désastreuse pour le traitement du paludisme mais également mettrait probablement en cause leur éventuelle utilisation en TPI chez la femme enceinte.

En Côte d'Ivoire il existe plusieurs CTA dont l'ASAQ et l'AL recommandées respectivement en première et seconde intention dans le traitement du paludisme simple à *P. falciparum* par le PNLP (Anonyme, 2008). Des études antérieures ont montré l'efficacité de ces deux associations (Offianan *et al.*, 2009 ; Faye *et al.*, 2010 ; Offianan *et al.*, 2011). Toutefois les travaux de Yavo *et al.* ont montré une baisse de la sensibilité de *P. falciparum in vitro* à l'amodiaquine (Yavo *et al.*, 2010) ainsi qu'à l'artesunate (Touré *et al.*, 2008). De plus le taux élevé des prévalences des gènes *pf dhfr*, *pf dhps* et *pf crt* dans la précédente étude pourrait traduire indirectement une inefficacité des CTA.

Dans ce contexte l'évaluation et le monitoring de l'efficacité thérapeutique des CTA sont une stratégie clé du récent plan développé par l'OMS pour identifier, contenir et éradiquer la résistance aux dérivés de l'artémisinine (WHO, 2011).

Le but principal de cette étude est d'actualiser face aux différents risques d'émergence de la résistance, les données sur l'efficacité thérapeutique des CTA

recommandées par le PNLP dans deux des 19 districts du pays d'autant plus que, le PNLP souhaite mettre à échelle (ensemble des districts et tous les âges) des interventions de prise en charge par ces deux CTA. Dans les zones de transmission intense, les échecs thérapeutiques sont rencontrés chez les enfants âgés de moins de cinq ans en premier à cause de leur relative absence d'immunité antipalustre. Il est donc impératif d'évaluer les antipaludiques en premier dans ce groupe de population si des échecs thérapeutiques ou une résistance devrait être détectée.

Il est donc proposé dans ce travail de vérifier l'hypothèse selon laquelle il n'existerait pas d'émergence de la résistance aux dérivés de l'artémisinine dans notre pays et que l'amodiaquine demeure un partenaire efficace pour ces molécules malgré une baisse de sensibilité *in vitro*. En somme les CTA demeurent toujours efficaces dans la prise en charge du paludisme malgré la conjugaison de différents facteurs prédisposant à l'émergence de la résistance à ces médicaments dans notre pays.

Objectif général

Evaluer l'efficacité thérapeutique de l'association ASAQ *versus* AL dans le traitement du paludisme simple à *P. falciparum* chez les enfants de 6 à 59 mois.

Objectifs spécifiques

- Comparer les RCPA à J28 après correction PCR dans les deux bras de traitement
- Comparer les clairances thermique, parasitaire et gamétocytaire dans les deux bras de traitement
- Comparer la tolérance clinique des deux CTA

I. MATERIEL ET METHODES

I.1. Type d'étude et période d'étude

Il s'agit d'un essai clinique, randomisé, ouvert, de non infériorité comparant l'efficacité et la tolérance de l'ASAQ *versus* AL dans le traitement du paludisme non compliqué à *P. falciparum* chez les enfants de moins de cinq ans.

Le protocole OMS de 28 jours (WHO, 2003) a été utilisé dans cette étude qui s'est déroulée de novembre 2008 à février 2009.

I.2. Sites d'étude

Les travaux se sont déroulés dans les districts sanitaires d'Aboisso (Hôpital Général d'Ayamé) et de Dabakala (Hôpital Général de Dabakala).

Ayamé est situé au sud-est de la Côte d'Ivoire dans la région du Sud Comoé, plus précisément dans le département d'Aboisso à 20 Km du chef-lieu de Département et à 134 km d'Abidjan. La population de la commune d'Ayamé, au moment de cette étude, était estimée à 13596 habitants et celle de la sous-préfecture à 35452 habitants.

Dabakala au nord du pays, est distant de 150 km de Bouaké et de 520 km d'Abidjan. La population était estimée à 123 348 lors du dernier recensement de 1998.

Les deux districts sont des sites sentinelles du PNLP pour l'évaluation de l'efficacité des antipaludiques. Les faciès sont de type équatorial et tropical respectivement à Ayamé et à Dabakala (Figure 21).

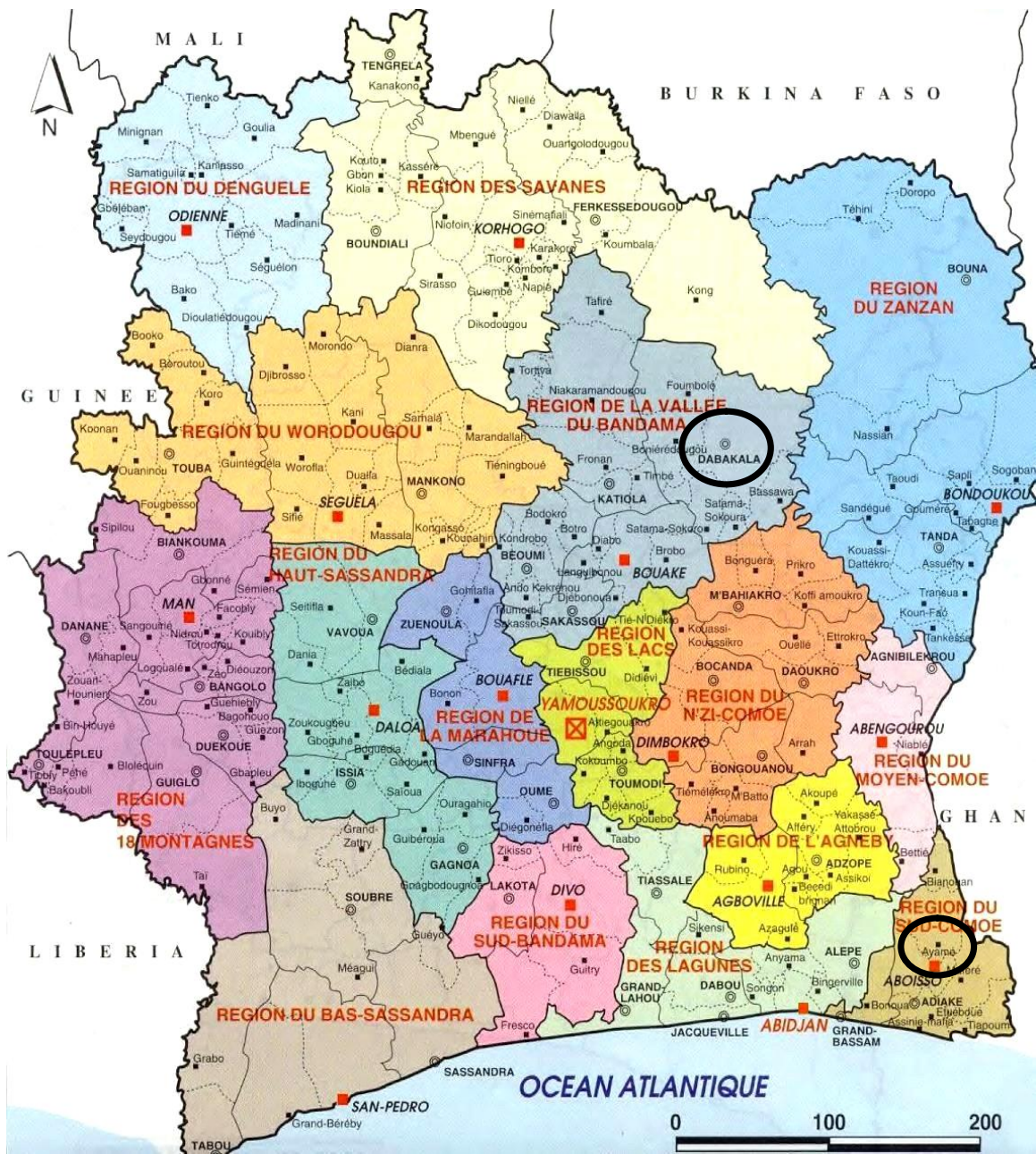


Figure 21 : Localisation géographique des sites d'étude.

http://www.parti-ecologique-ivoirien.org/img/carte-d-ivoire_administrative.jpg

[Consulté le 14 avril 2010]

I.3. Population d'étude

L'étude a porté sur les enfants de 6 à 59 mois révolus venus en consultation et présentant des signes cliniques évocateurs de paludisme simple.

Critères d'inclusion

Les critères suivants ont été retenus pour l'inclusion des patients :

- âge compris entre 6 et 59 mois ;
- goutte épaisse positive avec une infestation mono-spécifique à *P. falciparum* ;
- densité parasitaire comprise entre 2000 et 200 000 parasites asexués/ μ l de sang ;
- température axillaire $\geq 37,5$ °C ou température rectale/tympanique ≥ 38 °C ou Antécédents de fièvre dans les 24 heures ;
- se rendre aux visites de suivi indiquées et avoir un accès facile au site de l'étude ;
- consentement éclairé écrit fourni par les parents ou tuteurs légaux de l'enfant ;

Critères d'exclusion

- malnutrition grave (définie comme suit: enfant dont le rapport poids/taille est inférieur à 3 écart type, ou inférieur à 70% de la médiane des valeurs de référence normalisées NCHS/OMS, ou encore qui présentent un œdème symétrique touchant les deux pieds) ;
- signes généraux de danger ou d'autres signes de paludisme à *P. falciparum* grave et compliqué tels qu'ils figurent dans les définitions actuelles de l'OMS ;
- état fébrile dû à une maladie autre que le paludisme ;
- antécédents de réaction d'hypersensibilité due à l'association Artémether/Luméfantrine et/ou Amodiaquine /Artésunate ou à l'un des constituants ;

- prise d'antipaludique (ou de médicament présentant une activité antiplasmodiale connue) dans la semaine précédant l'inclusion ;
- faible probabilité de suivi pendant les 28 jours.

Les signes généraux de danger liés à un paludisme grave sont énumérés ci-dessous :

- incapacité à boire ou à prendre le sein ;
- le fait de tout vomir ;
- antécédents récents de convulsions ;
- léthargie ou perte de connaissance ;
- incapacité à se tenir assis ou debout.

Critères d'arrêt

- Retrait du consentement par le parent ;
- Événements indésirables graves ;
- Réponse thérapeutique non satisfaisante ;
- Violation du protocole : il y a violation du protocole lorsqu'un participant de l'étude est retiré de cette dernière à cause d'un événement qui ne permet pas une interprétation continue et précise de la réponse au traitement (prise d'antipaludiques autres que ceux utilisés dans le protocole) ;
- Patient perdu de vue ;
- Décès.

I.4. Taille de l'échantillon

La taille de l'échantillon a été calculée en utilisant les recommandations OMS d'évaluation de l'efficacité thérapeutique des antipaludiques (WHO, 2003).

Il faut trois types d'informations pour déterminer la taille de l'échantillon convenable à savoir la proportion d'échecs cliniques anticipée dans la population (P), le niveau de confiance (en général 95%) et la précision (d) (généralement comprise entre 5 et 10%). Ainsi pour déterminer la taille de notre échantillon nous avons estimé que la proportion d'échecs cliniques probables avec les CTA étudiées ne sera pas supérieure à 10% pour un intervalle de confiance de 95% et une précision de 10%. En tenant compte de ces paramètres un minimum de 50 patients est requis dans chaque groupe de traitement par site. En considérant un taux de perdu de vue de 10 %, l'échantillon a été ramené à 60 enfants par bras et par site.

I.5. Randomisation et traitement

Les patients inclus ont été randomisés dans l'un des groupes de traitement notamment le groupe ASAQ et le groupe AL. La liste de randomisation générée par un ordinateur a été réalisée par un statisticien indépendant.

Les médicaments ont été administrés selon le poids corporel en une prise pour l'ASAQ et en deux prises pour AL avec une durée de traitement de trois jours pour chacun.

L'ASAQ (ASAQ Winthrop[®]; Sanofi-Aventis, Paris, France) se présente sous forme de combinaison fixe. Elle a été co-développée avec le DNDi et a été approuvée et vendue en Afrique depuis 2007.

La dose administrée était de un comprimé 25 /67,5 mg par jour pendant trois jours pour les enfants dont le poids corporel était compris entre 5–9 kg inclus. Les enfants dont le poids était compris entre 9 et 18 kg et ceux dont le poids était supérieur à 18 kg recevaient un comprimé dosé à 50 /135 mg et 100 /270 mg respectivement par jour pendant trois jours.

L'association AL se présente sous forme de comprimés dosés à 20/120 mg (Artrine®; Lic Pharma, Abidjan Côte d'Ivoire) et administrée deux fois par jour pendant trois jours.

Les enfants de poids corporel compris entre 5 et 15 kg recevaient un comprimé par dose et ceux dont le poids variait entre 15 et 20 kg, deux comprimés par dose. Le régime de 6 doses a été utilisé et reparti en deux prises par jour.

La première dose était administrée à l'inclusion et la seconde dose huit heures après et ensuite deux doses espacées de douze heures pour les deux jours suivants. Du yaourt était administré aux patients juste après la prise des médicaments. En cas de vomissements dans les 30 minutes suivant la prise du médicament une dose complète était ré-administrée. Si les vomissements persistaient le patient était exclu et pris en charge selon les directives du PNLP.

L'administration des doses a été faite par l'équipe de recherche.

I.6. Suivi clinique et parasitologique

Les patients retournaient au site d'étude les jours 1, 2, 3, 7, 14, 21 et 28 pour l'administration du traitement, l'évaluation clinique, la réalisation des gouttes épaisses, des frottis sanguins et des confettis en cas d'échec thérapeutique. Ils pouvaient également revenir au site de l'étude à tout moment si le patient présentait un signe quelconque. Au cours du suivi clinique les symptômes tels que la fièvre, les céphalées, les douleurs quelle que soit la localisation, l'ictère, l'asthénie, l'anorexie, les vomissements, les nausées, la diarrhée, le prurit, l'hépatomégalie et la splénomégalie étaient systématiquement recherchés.

L'évaluation parasitologique était basée sur la mise en évidence de formes asexuées et de gamétocytes.

I.7. Procédures de Laboratoires

I.7.1. Goutte épaisse et frottis sanguins

Les gouttes épaisses et les frottis sanguins ont été préparés avec du GIEMSA dilué au 1/10^{ème}. La lecture s'est faite au microscope optique à l'objectif X100 avec de l'huile à immersion afin de déterminer la densité parasitaire et l'espèce plasmodiale. La densité parasitaire a été estimée en comptant le nombre de parasites asexués pour 200 leucocytes sur la base de 8000 leucocytes/mm³ comme taux standard de leucocytes.

En cas de présence de gamétocytes, leur densité était estimée pour 1000 leucocytes. Une lame était considérée comme négative après la lecture de 200 champs microscopiques. Toutes les lames ont été lues par deux microscopistes indépendants. En cas de discordance, une troisième lecture était faite par un troisième microscopiste.

I.7.2. Polymérase Chain Réaction (PCR)

L'ADN de *P. falciparum* a été extrait à partir des confettis selon la méthode au Qiagen (voir chapitre I).

- **PCR primaire:**

Nous avons utilisé en premier lieu, la paire d'amorce *m*sp-2 pour entamer la première réaction d'amplification (Tableaux XVIII, XIX, XX).

Tableau XVIII: Concentrations des réactifs et volumes réactionnels de la PCR-I

<i>msp-2</i>		
Réactifs	Concentration	V/tube (µl)
H ₂ O stérile pure		7,3
Tampon	5X	5
MgCl ₂	25mM	1,5
dNTP	5mM	1
Amorce directe	10µM	7,5
Amorce reverse	10µM	2,5
Taq polymérase	5U/µL	0,2
Volume Mix (µl)		20
ADN matriciel (µl)		5
Volume réactionnel total (µl)		25

Tableau XIX : Amorces pour la PCR-I

Gène	Amorce	Séquence
msp-2	M2-OF	ATGAAGGTAATTAACATTGTCTATTATA
	M2-OR	CTTTGTTACCATCGGTACATTCTT

Tableau XX : Programme d'amplification MSP-2

Nombre de répétition	Durée	Température (°C)	Étape
1X	5 min	94	Dénaturation initiale
31X	15s	94	Nombre de cycles PCR
	1min30	58	
	2min	70	
1X	10min	72	Elongation finale
Hold	∞	4	

- **PCR secondaire ou Nested-PCR ou PCR-II:**

Les deux autres paires d'amorces spécifiques aux familles FC27 et 3D7 ont été utilisées pour la PCR secondaire à partir du produit de la première PCR (Tableaux XXI, XXII, XXIII).

Tableau XXI : Concentrations des réactifs et volumes réactionnels de la PCR-II

FC27 & 3D7 Réactifs	Concentration	V/tube (µl)
H ₂ O stérile pure		10,3
Tampon	5X	2,5x2
MgCl ₂	25mM	1,5
dNTP	5mM	1
Amorce directe	10µM	2,5
Amorce reverse	10µM	2,5
Taq polymérase	5U/µl	0,2
Volume Mix (µl)		23
ADN matriciel (µl)		2
Volume réactionnel total (µl)		25

Tableau XXII : Amorces pour la PCR II

Gène	Familles	Amorces	Séquences
	FC27	M2-FC27F	AATACTAAGAGTGTAGGTGTCARATGCTCCA
		M2-FC27R	TTTTATTTGGTGCATTGCCAGAACTTGAAC
	3D7	M2-3D7F	AGAAGTATGGCAGAAAGTAAKCCTYCTACT
		M2-3D7R	GATTGTAATTCGGGGGATTCAGTTTGTTCG

Tableau XXIII : Programme d'amplification pour les familles FC27/3D7 de MSP-2

Nombre de répétition	Durée	Température (°C)	Étape
1X	5 min	94	Dénaturation initiale
31X	15s	94	Nombre de cycles PCR
	1min30	57	
	2min	70	
1X	10min	72	Elongation finale
Hold	4		

- **Migration:**

La présence ou l'absence de produits PCR a été confirmée par la révélation des bandes après la migration électrophorétique. Le gel à 1% ayant servi à cette migration, a été préparé dans 100 ml de TBE (100 mM de Tris, 100 mM de borate, 5 mM d'EDTA) avec 1 g de poudre d'agarose pure. Au gel obtenu après ébullition et homogénéisation, a été ajouté du Bromure d'Ethidium (concentration cible = 6 µl dans 100 ml de gel). Pour la migration proprement dite, 10 µl de produit final PCR combiné au préalable à du tampon de charge (5µl) ont été déposés dans un puits (un puits par échantillon). Par ailleurs, 5µl d'un marqueur de poids moléculaire SmartLadder 1kb (Eurogentec) a été déposé isolément dans un autre puits. Les bandes de l'électrophorèse ont été révélées dans la lumière UV après 20 mn de migration à 100V (lampe à vapeur de mercure $\lambda = 312\text{nm}$). Le gel sorti de la cuve de migration a été placé sur la plaque du trans-luminateur. Les produits PCR ont été décelés grâce au marquage au BET qui s'intercale entre les bases de la molécule d'ADN bicatenaire, créant

ainsi une fluorescence de couleur orangée en présence de rayonnement UV. Cette fluorescence est beaucoup plus prononcée dans les zones dans lesquelles est situé le fragment d'ADN recherché.

- **Interprétation des données :**

La comparaison des profils génétiques (bandes obtenues à l'électrophorèse) entre J0 et le jour d'échec permet de distinguer les recrudescences des réinfestations (nouvelles infestations). Une nouvelle infestation est définie comme une infestation due à des parasites dont tous les allèles sont différents de ceux des parasites de l'infestation initiale c'est-à-dire à J0 pour un seul locus ou plusieurs loci testés. Pour la recrudescence au moins un allèle à chaque locus devrait être identique chez les deux types souches ([MMV/WHO, 2007](#)).

I.8. Analyse statistique des données

L'analyse a été faite en ITT et en PP.

La comparabilité des deux groupes a été effectuée par le test de Student pour les variables continues et par le test du Chi² pour les variables discrètes avec correction de Yates en cas d'effectif inférieur à 5. Si les conditions d'application ne sont pas respectées, les comparaisons sont effectuées par le test non paramétrique de Mann-Whitney ou par le test de Fisher.

I.9. Considérations éthiques et réglementaires

La présente étude a été conduite selon la Déclaration d'Helsinki et les dispositions légales et réglementaires de notre pays en la matière. Le protocole a été soumis et approuvé par la Comité National d'Ethique et de la Recherche de Côte d'Ivoire. Un consentement éclairé a été requis des parents ou des tuteurs légaux des enfants. Le formulaire de consentement éclairé devrait être signé par ces derniers avant toute inclusion de l'enfant. Si les parents ou les tuteurs étaient incapables de lire ou de signer, un témoin était exigé afin d'expliquer dans la

langue appropriée les procédures et exigences de l'étude. Dans ce cas l'empreinte digitale du parent ou tuteur était apposée sur le formulaire de consentement éclairé ainsi que la signature du témoin.

I.10. Critères de jugement de la réponse thérapeutique (Annexe 2)

La réponse thérapeutique a été classée en RCPA, ETP, ECT et EPT.

Le premier critère de jugement était le taux de guérison à J28 défini comme la proportion de patients ayant présenté une RCPA à J28 après correction PCR.

Les clairances thermique, parasitaire et gamétocytaire ainsi que la tolérance au médicament étaient considérées comme les critères secondaires de jugement.

Tous les effets secondaires ont été recherchés passivement et activement.

II. RESULTATS

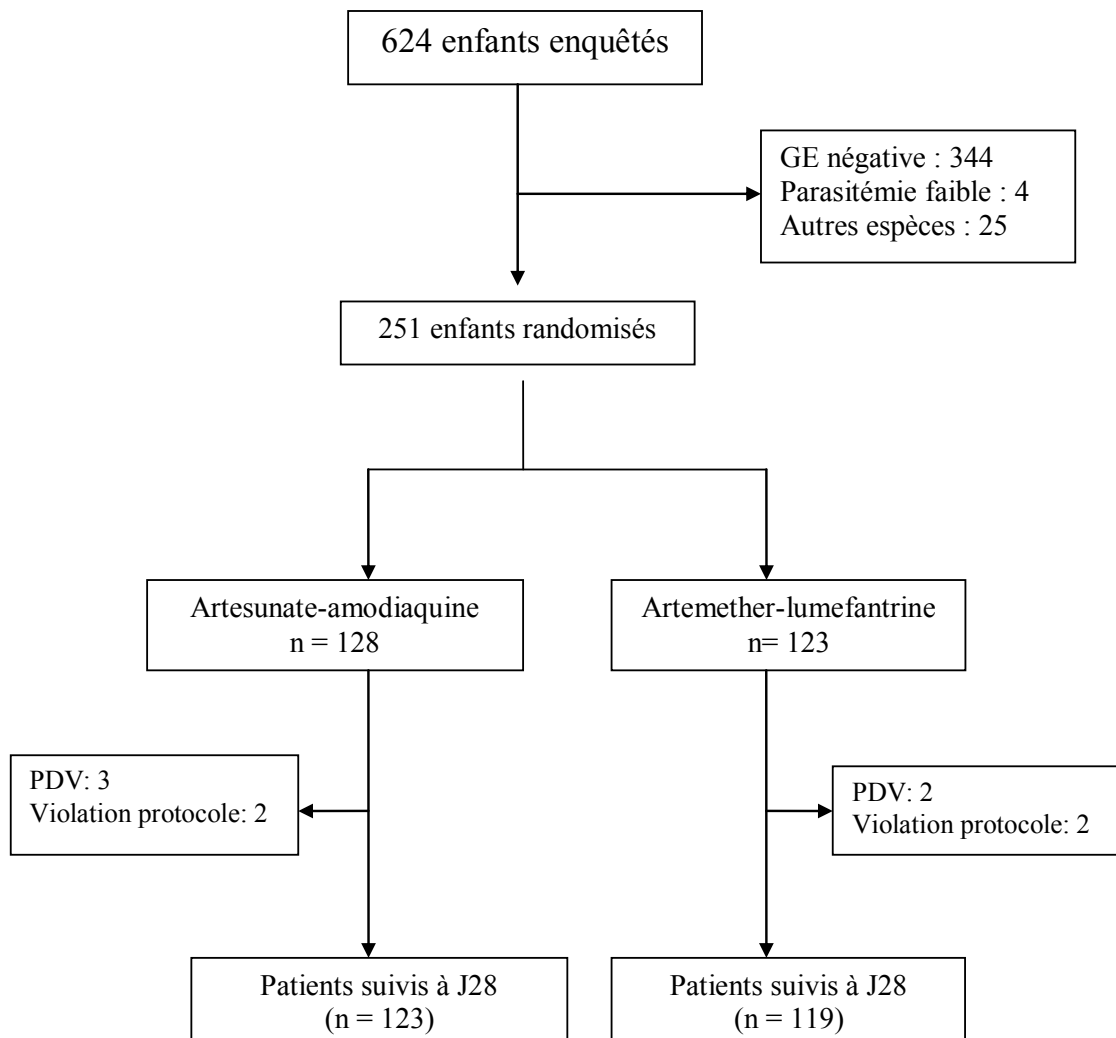


Figure 22: Profil de l'essai clinique

Au total 123 (ASAQ) et 119 (AL) patients ont été suivis régulièrement jusqu'à J28.

Tableau XXIV : Caractéristiques des patients à l'inclusion

	ASAQ (n=128)	AL (n= 123)
Age moyen (mois)	31, 24±1,34 (6-59)	34,41± 1,52 (7-59)
Sexe (M/F)	68 (60)	65 (58)
Poids moyen (kg)	12,06 ± 0,27 (5,4 -19)	12,49± 0,31 (6,5 - 20)
T° moyenne (°C)	38,61± 0,09 (36 - 41)	38,12 ± 0,08 (36,4- 40,7)
DP moyenne	30 487± 3129 (2000-171152)	24901± 2898 (2000 - 127040)

ASAQ= Artésunate-amodiaquine; AL= Artéméther-luméfantrine, DP= Densité Parasitaire
Age (p= 0, 18 Chi-square) Sexe (p= 1, Chi-square); Poids moyen (p= 0,43 Student t test);
Température moyenne (p= 0,0005 Student t test); DP moyenne (p= 0,22 Student t test)
Les deux groupes d'étude étaient comparables à l'inclusion selon l'âge, le poids, le sexe, la température et la densité parasitaire.

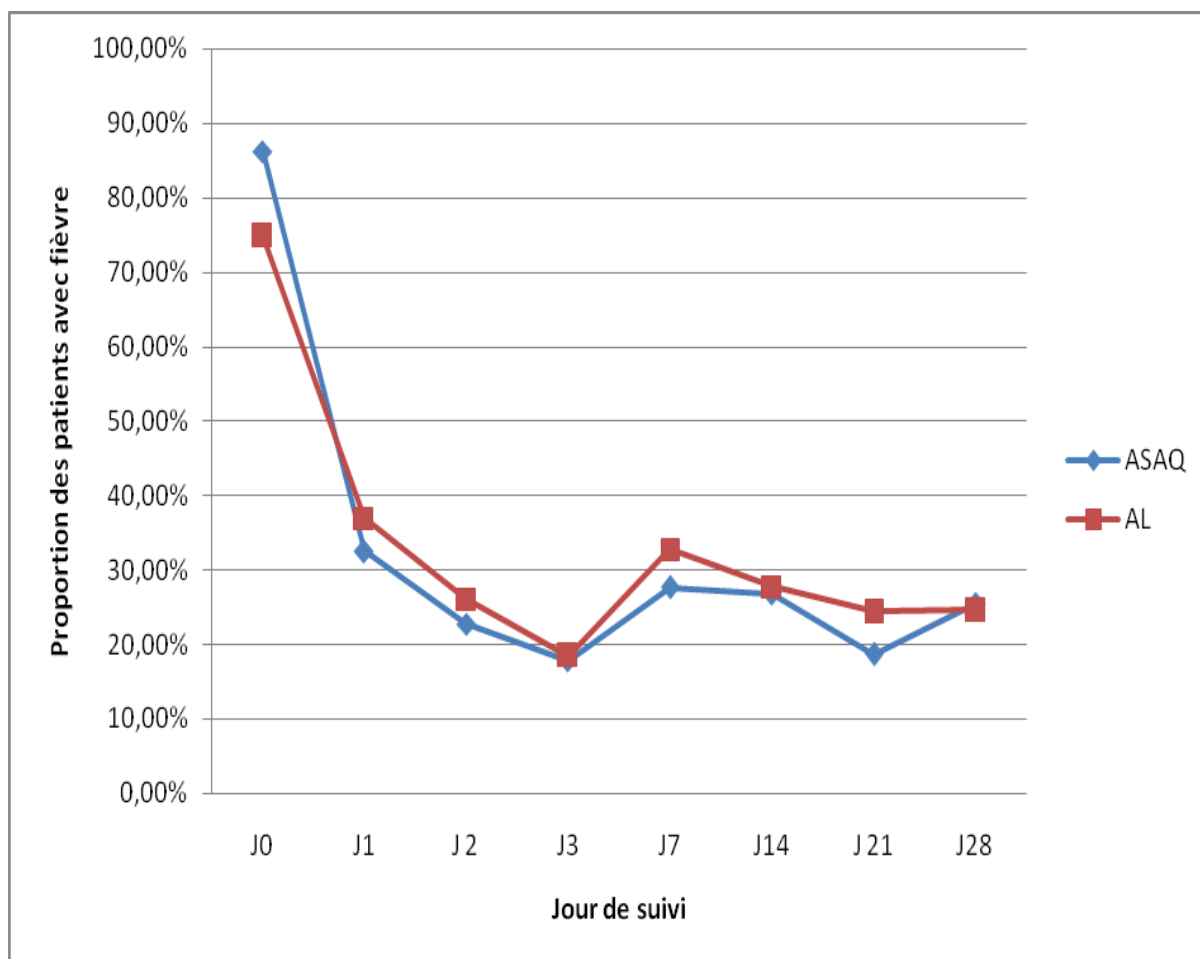


Figure 23 : Proportion des patients avec une fièvre au cours du suivi

Au jour 2 la proportion des patients apyrétiques était de 77,2% (95/123) et 73,9% (88/119) respectivement dans les groupes ASAQ et AL. Au jour 3 cette proportion était de 82,1% (101/123) et 81,5% (97/119) dans les groupes ASAQ et AL respectivement. La différence n'était pas statistiquement significative dans les deux groupes ($p > 0,05$).

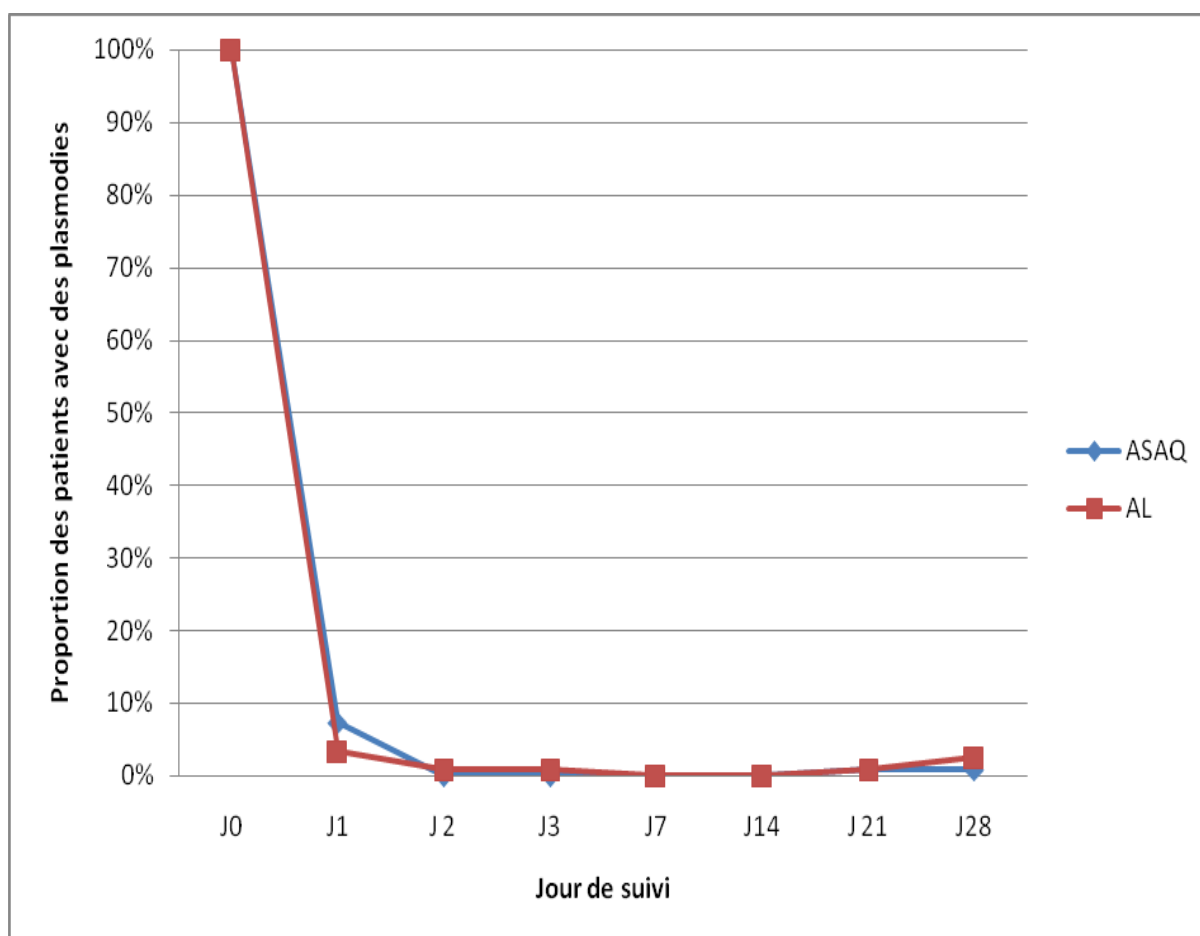


Figure 24: Proportion des patients avec des plasmodies au cours du suivi

Les deux traitements ont présenté une rapide clairance parasitaire avec une différence statistiquement non significative. Cependant la parasitémie a persisté chez un patient dans le groupe AL jusqu'à J3.

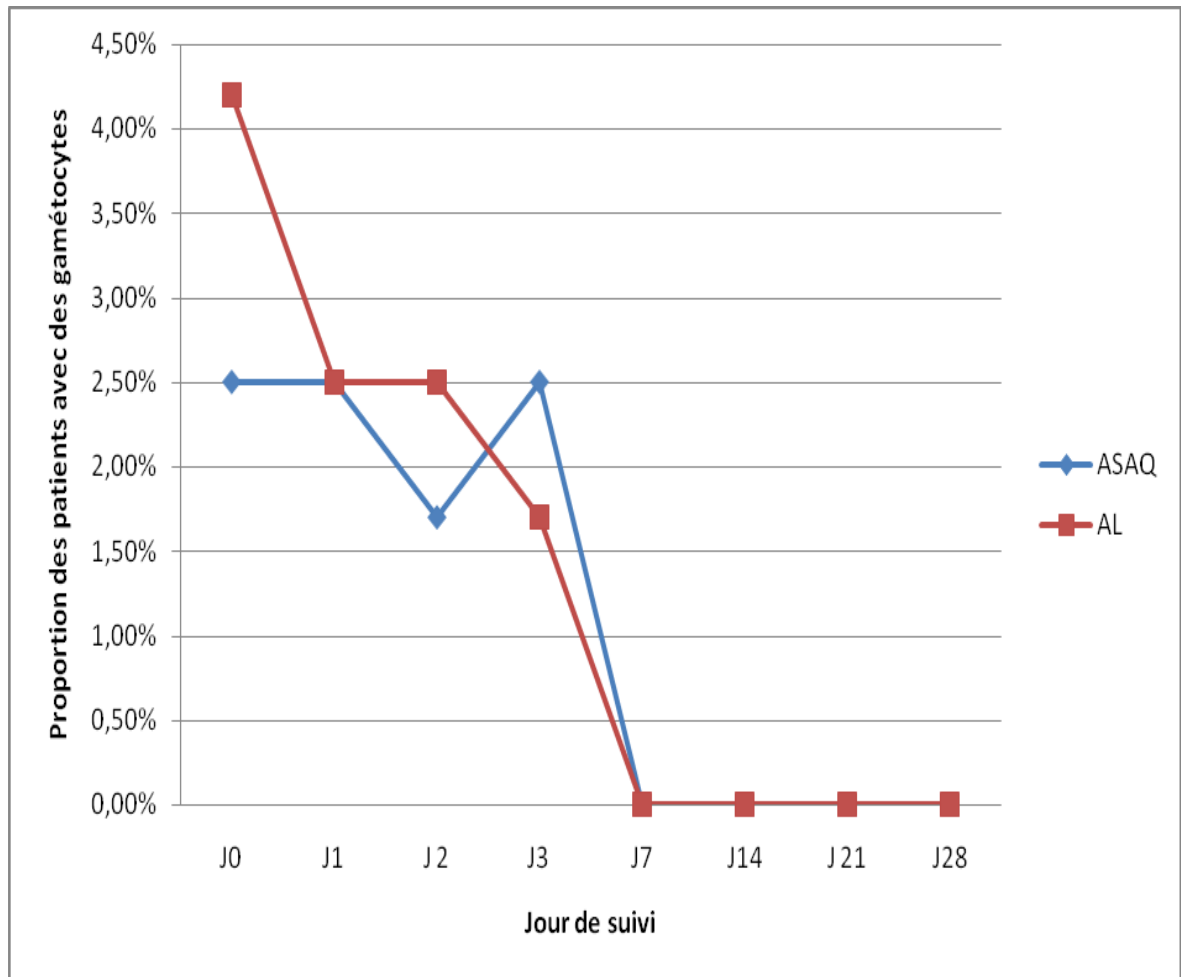


Figure 25 : Proportion des patients avec des gamétocytes de *P.falciparum* au cours du suivi

A l'inclusion 3 et 5 patients ont présenté des gamétocytes dans les groupes ASAQ et AL respectivement. A J3, 3 et 2 patients présentaient respectivement des gamétocytes dans chaque groupe. Aucun patient n'a présenté de gamétocytes entre les jours 7 et 28.

Tableau XXV : Réponse thérapeutique de l'artésunate-amodiaquine et de l'artéméther-lumefantrine à J28

	Analyse en Intention de Traiter (ITT)		<i>p</i>
	ASAQ	AL	
Patients enrôlés	128	123	
Patients vus à J28	123/128 (96, 1%)	119/123 (96,8%)	1
PDV, Violation protocole	5/128 (3, 91)	4/123 (3, 3%)	1
ET à J 28	7/128 (5, 5%)	8/123 (6, 5%)	0,73
RCPA à J28	121/128 (94, 5)	115/123 (93,50)	0,73
ET à J28 après correction PCR	5/128 (3, 9%)	4/123 (3,3%)	1
RCPA à J28 après correction PCR	123/128 (96, 1%)	119/123 (96, 8%)	1
	Analyse en per-protocole (PP)		
	ASAQ	AL	
Patients vus à J28	121	119	
ET à J28	2/123 (1, 6%)	4/119 (3, 4%)	0,44
RCPA à J28	121/123 (98, 4%)	115/119 (96, 6%)	0,44
ET à J28 après correction PCR	0/123 (0%)	0/119 (0%)	1
RCPA à J28 après correction PCR	123/123 (100%)	119/119 (100%)	1

La proportion de RCPA était de 94,5% (121 de 128) et 93,5% (115 de 123) dans les groupes ASAQ et AL en ITT avant correction PCR. Après correction PCR elle était de 98,4% (ASAQ) et 96,6% (AL).

L'analyse en PP a montré une RCPA de 98,4% et 96, 6% dans les groupes ASAQ et AL respectivement avant correction PCR. Après correction PCR le taux de RCPA était de 100% dans chaque groupe.

Tableau XXVI: Reponse thérapeutique à J28 selon le site d'étude en analyse PP

Type de reponse	ASAQ		<i>p</i>	AL		<i>p</i>
	Ayamé	Dabakala		Ayamé	Dabakala	
RPCA	96,72 (59/61)	100% (62/62)	0,24	98,33 (59/60)	94,92 (56/59)	0,36
ETP	0	0	–	0	0	-
ECT	0	0	–	0	0	-
EPT	3,28 (2/61)	0	1	1,67 (1/60)	5,08 (3/59)	0,36

L'ASAQ semble être plus efficace à Dabakala qu'Ayamé. Par contre l'AL semble plus efficace à Dabakala qu'Ayamé. Cette différence n'est pas statistiquement significative.

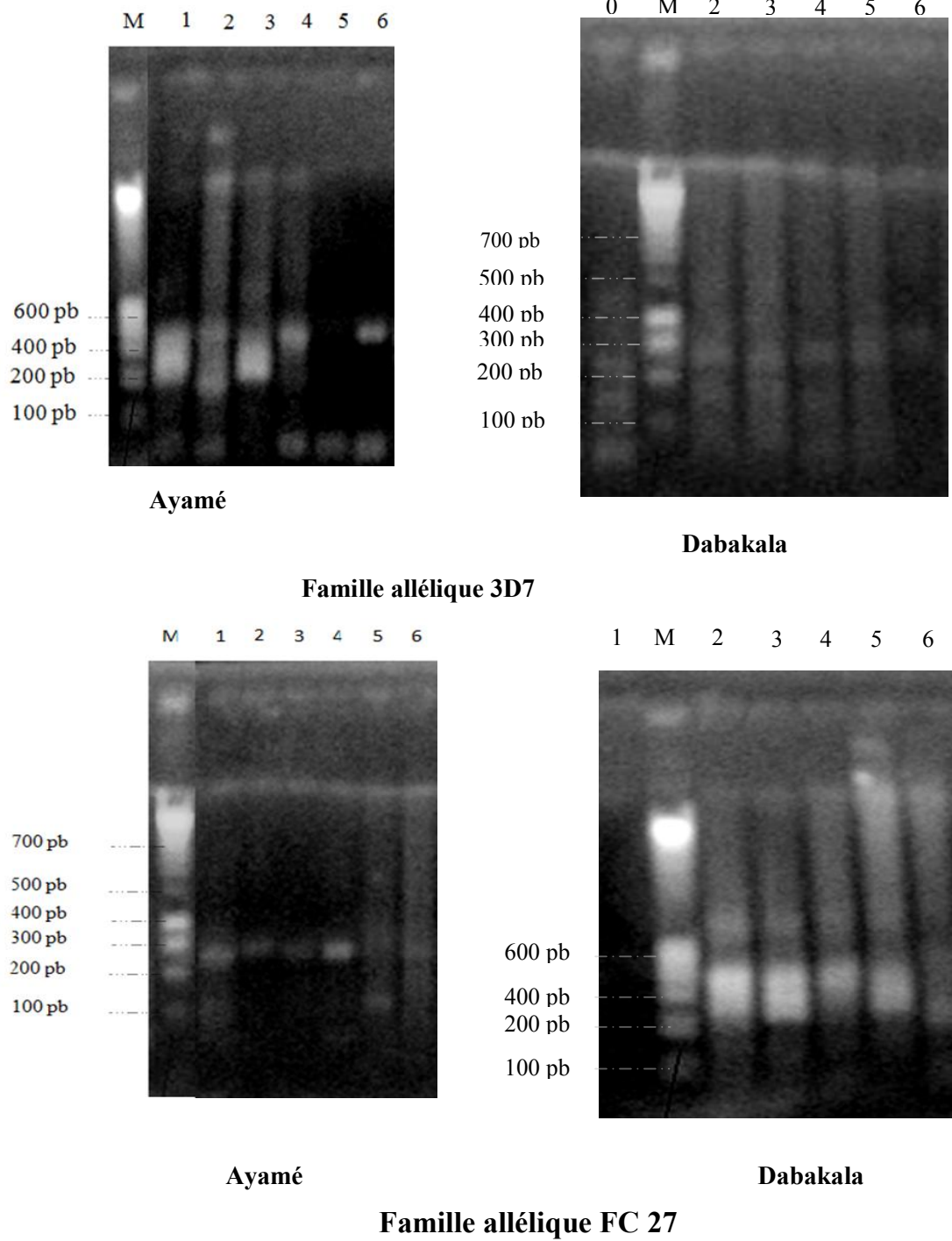


Figure 26 : Electrophoregramme des familles alléliques 3D7 et FC27

NB : Les chiffres impairs correspondent aux jours d'inclusion et les chiffres pairs aux jours d'échec.

Tableau XVII : Répartition des effets secondaires dans les deux groupes

Effets secondaire	ASAQ (n= 128)		AL (n=123)		p
	Effectif	%	Effectif	%	
Asthénie	18	14,1	6	4,9	0,01
Anorexie	5	3,9	2	3,3	0,45
Hypersialorrhée	12	9,4	7	5,7	0,27
Vomissements	8	6,3	4	3,3	0,38
Diarrhée	6	4,7	3	2,4	0,50
Douleurs abdominales	10	7,8	4	3,3	0,17
Nauséé	15	11,7	10	8,1	0,34

Les effets secondaires d'origine gastro-intestinale ont été les plus fréquemment observés dans les deux groupes avec une incidence élevée dans le groupe ASAQ.

III. DISCUSSION

L'efficacité des dérivés de l'artémisinine est bien établie et les CTA sont recommandées dans le traitement du paludisme simple à *P. falciparum* dans tous les pays d'endémie palustre (White, 2008 ; WHO, 2010).

Des inquiétudes sur l'efficacité de ces CTA sont apparues avec l'apparition de la résistance aux dérivés de l'artémisinine à la frontière thaïlanno-cambodgienne (Noedl *et al.*, 2008 ; WHO 2010 ; Bethell *et al.*, 2011).

En Côte d'Ivoire de nombreuses CTA sont enregistrées et vendues et largement disponibles dans le marché parallèle.

La résistance de *P. falciparum* à l'amodiaquine est bien établie dans la plupart des pays africains (Tinto *et al.*, 2008 ; Tekete *et al.*, 2009 ; Yavo *et al.*, 2010).

Ainsi on pourrait avoir des inquiétudes concernant l'efficacité de ces CTA en particulier l'ASAQ. C'est pour cette raison que nous avons comparé l'efficacité et la tolérance de l'ASAQ et l'AL dans le traitement du paludisme simple à *P. falciparum* chez les enfants de moins de cinq ans dans deux districts sanitaires de notre pays. Dans notre étude l'ASAQ administrée en une prise pendant 3 jours est aussi efficace que l'AL administrée en deux prises par jour pendant trois jours. Les résultats ont montré un taux élevé de RCPA dans chaque groupe de traitement après un suivi de 28 jours. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans plusieurs pays en Afrique Sub-Saharienne (Adjei *et al.*, 2008 ; Ndiaye *et al.*, 2009 ; Gbotosho *et al.*, 2011) démontrant une bonne efficacité de ces deux CTA à court terme (28 jours de suivi). Nos résultats confirment ceux des études conduites chez les enfants Ghanéens montrant un taux d'échec clinique et parasitologique plus faible dans le groupe ASAQ que dans le groupe AL (Koram *et al.*, 2005 ; Kobe *et al.*, 2008 ; Owusu-Agyei *et al.*, 2008).

Ces résultats sont contraires à ceux provenant d'Afrique de l'Est et d'Afrique Centrale qui ont démontré une efficacité plus élevée de l'AL comparée à celle de l'ASAQ surtout dans la prévention des ré-infestations (Dorsey *et al.*, 2007 ;

[Kabanywany et al., 2007](#)). La différence d'efficacité de l'ASAQ entre l'Afrique de l'ouest et l'Afrique de l'est et Centrale pourrait s'expliquer par une prévalence plus élevée des souches amodiaquinorésistantes en Afrique de l'Est et Centrale.

Dans notre étude les deux traitements ont montré des clairances thermique, parasitaire et gamétocytaire équivalentes. Comme déjà rapporté les deux CTA ont montré une rapide clairance parasitaire dans notre étude. Le retard de clairance parasitaire (>2jours) est survenu chez un seul patient dans le groupe AL. Ce retard de clairance pourrait suggérer une baisse de sensibilité de l'AL ([Carrara et al., 2009](#)). Nos résultats ont donc démontré une bonne sensibilité *in vivo* de l'ASAQ et de l'AL dans nos sites d'étude sur une période de 28 jours de suivi.

Le temps de suivi sur 28 jours de nos patients constitue cependant une limite à cette étude. En effet la période de suivi de 28 jours pourrait sous estimer le taux d'échec thérapeutique dans les deux groupes de traitement. Seuls les essais cliniques sur une période de plusieurs mois sont appropriés pour comparer les bénéfices et les risques des différents antipaludiques en particulier dans les régions à transmission élevée ([Laufer et al., 2007](#)).

Des études ont montré que la période de suivi de 28 jours sous estimait le taux d'échec thérapeutique de 20% pour les médicaments comme la luméfántrine et la SP dont la demi-vie d'élimination est de 3-6 jours et de 40% pour les médicaments à demi-vie longue (1-3 semaines) comme la déséthylamodiaquine, le métabolite actif de l'amodiaquine ([Krishna & White, 1996](#) ; [Bloland, 2001](#) ; [Stepniewska et al., 2004](#)).

En cas de suivi plus long, le taux d'échec thérapeutique pourrait donc être élevé. Un essai clinique conduit au Ghana, comparant l'efficacité de l'ASAQ et de l'AL sur une période d'un an a montré un taux de RCPA après correction PCR de 95,3% and 94,2% respectivement ([Badoe et al., 2008](#)). Cette étude n'a pas montré de différence significative dans la survenue des ré-infestations ou des

effets secondaires entre les deux groupes de traitement. Cependant les longues périodes de suivi rendent de plus en plus difficile la différenciation entre ré-infestations et recrudescences.

Les effets secondaires fréquemment rencontrés dans notre étude sont d'origine gastro-intestinale notamment la nausée, les vomissements et la diarrhée avec une incidence plus élevée dans le groupe ASAQ. L'asthénie était également plus observée dans ce groupe. Ces différents signes sont également retrouvés chez les patients présentant un accès palustre. Il est donc difficile d'établir une relation entre ces signes et les médicaments. Dans l'ensemble les médicaments ont été bien tolérés. En effet aucun patient n'a été exclu de l'étude pour un effet secondaire récurrent. De plus aucun effet secondaire grave n'a été signalé au cours de notre étude. Nos résultats sont en accord avec des études antérieures portant sur la tolérance de ces deux CTA ([Brasseur *et al.*, 2007](#) ; [Faye *et al.*, 2010](#) ; [Adjei *et al.*, 2008](#) ; [Ndiaye *et al.*, 2009](#) ; [Gbotosho *et al.*, 2011](#)).

Une autre limite de cette étude est l'âge des patients qui rend difficile l'évaluation des effets secondaires en général mais surtout celle des signes neurologiques tels que les vertiges. En effet les vertiges ont été décrits avec l'utilisation de l'amodiaquine.

Au total, les deux associations ASAQ et AL ont démontré une bonne efficacité clinique et parasitologique et ont été bien tolérées par les patients dans nos deux sites d'étude. Après plus de 5 ans d'utilisation dans notre pays et malgré une relative baisse de sensibilité *in vitro* à l'amodiaquine, l'émergence de la résistance à la frontière thailando-cambodgienne, la persistance des monothérapies et les CTA sous dosées dans le marché parallèle, aucune émergence de la résistance de *P.falciparum* à ces médicaments n'a été observée dans nos deux sites d'étude. Cependant un retard de clairance parasitaire a été observé chez l'un de nos patients dans le groupe AL. Ce qui pourrait suggérer une baisse de sensibilité de l'AL. Les deux CTA peuvent toujours être recommandées par le PNLP dans le traitement du paludisme simple à

P. falciparum dans tout le pays.

Le PNLP pourrait donc mettre à échelle (ensemble des districts et tous les âges) les interventions de prise en charge par ces deux CTA. Le déploiement de ces CTA demeure actuellement un challenge majeur pour le PNLP.

Les résultats de cette étude permettront également de mettre en route des essais cliniques sur l'efficacité des dérivés de l'artémisinine en TPI en remplacement éventuel de la SP. L'évaluation de l'efficacité thérapeutique et de la tolérance, les tests *in vitro* et l'étude des marqueurs moléculaires de résistance sont essentiels pour adapter les politiques de prise en charge du paludisme.

L'émergence et la propagation rapide de la résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques tels que la CQ et la SP nous recommandent de maintenir l'évaluation des CTA de façon régulière à travers tout le pays. Pour prévenir la menace de la résistance aux dérivés de l'artémisinine, des actions urgentes doivent être menés telles que définies par le GPARC.

Les recommandations du GPARC portent notamment sur une évaluation continue et régulière des CTA, un accès au diagnostic et aux traitements par les CTA répondant aux normes GMP et un investissement dans la recherche sur les marqueurs de résistance aux dérivés de l'artémisinine. Toutes ces recommandations devront être soutenues par une mobilisation des ressources et des actions motivées.

Conclusion

La totalité des pays d'endémie palustre ont adopté sous l'impulsion de l'OMS les CTA dans le traitement du paludisme simple à *P. falciparum* depuis plus de cinq ans. L'apparition récente de la résistance aux dérivés de l'artémisinine à la frontière thaïlano-cambodgienne demeure une préoccupation majeure pour nos pays. La présente étude avait pour but d'évaluer l'efficacité des traitements de première et de seconde intention dans le traitement du paludisme simple à *P. falciparum* chez les enfants de moins de cinq ans à Ayamé et Dabakala. Le protocole OMS de 28 jours a été utilisé. Cette étude a démontré que les deux CTA demeurent efficaces et bien tolérées chez les enfants de moins de cinq ans et qu'aucune émergence de la résistance aux dérivés de l'artémisinine n'a été détectée dans les deux sites d'étude. Par conséquent, le PNLP pourrait continuer à recommander ces deux CTA. Mais il demeure impératif que le PNLP avec l'appui des structures de recherche puisse suivre de façon régulière et continue l'efficacité de ces CTA à travers tout le pays à la recherche d'une éventuelle apparition de la résistance aux dérivés de l'artémisinine.

CONCLUSION GENERALE

Le paludisme malgré les efforts consentis afin de le contrôler, demeure un grave problème de santé publique. En zone d'endémie palustre, les femmes enceintes constituent avec les enfants de moins de cinq ans, les deux populations à risque. Les conséquences du paludisme gestationnel sont désastreuses non seulement pour la femme enceinte mais également pour l'enfant à naître.

Depuis plus de cinq ans, la presque totalité des pays d'endémie palustre ont adopté le TPI avec la SP comme l'une des stratégies essentielles de prévention du paludisme chez la femme enceinte. Cette stratégie a montré son efficacité dans la prévention des effets morbides du paludisme chez la femme enceinte.

Mais l'augmentation de la résistance de *P. falciparum* à la SP dans les régions à paludisme stable rend hypothétique l'utilisation continue de la SP en TPI chez la femme enceinte.

Le but de ce travail était de vérifier si la stratégie par la SP lors du TPI est effective, efficace, et peut encore être maintenue en Côte d'Ivoire pendant quelques années.

La première partie de ce travail a porté sur l'analyse moléculaire par séquençage automatique des gènes *pfdhfr*, *pfdhps* et *pfcr1* à Anonkoua-kouté, Bonoua et Samo.

A Anonkoua-kouté 34,6%, 51,1% et 14,3% des isolats portaient respectivement des allèles sauvages, mutants purs et mixtes du gène *pfdhfr*.

Le triple mutant a été observé chez 46,6% des isolats.

Des simples mutants ou doubles mutants aux codons 51 et 59 ont été mis en évidence dans notre étude. Les simples mutants I-51 et R-59 étaient retrouvés respectivement chez 3,7% et 2,3% des isolats tandis que le double mutant I-51/R-59 était porté par 2,3% des isolats. A Bonoua et Samo, la mutation clé pure *pfdhfr* N-108 associée aux mutations R-59 (41,9% à Samo et 50% à Bonoua) et I-51 (19,4% à Samo et 32,6% à Bonoua) était présente chez 45,2% et 52,2% des isolats respectivement.

L'analyse du gène *pf dhps* à Anonkoua-kouté a montré que la prévalence des isolats *dhps* mutants était la plus élevée avec 70,20%, suivie de celle des isolats *dhps* mixtes (25 %) et enfin les isolats *dhps* sauvages (4,80%).

A Samo et Bonoua la prévalence de la mutation *dhps* G-437 était très élevée avec 80% et 100% respectivement. Ces résultats démontrent le niveau élevé de la résistance de *P.falciparum* à la SP dans nos trois sites d'étude. Ce niveau de résistance pourrait s'expliquer principalement par la pression médicamenteuse exercée sur le parasite.

A Anonkoua-kouté, Bonoua et Samo, le triple mutant pur *pf crt* I-74/E-75/T-76 était porté respectivement par 81,8%, 100% et 86,4% des isolats démontrant le niveau élevé de résistance à la chloroquine dans ces zones. La chloroquine, malgré son retrait en 2003 a continué à toujours être utilisée dans nos zones d'étude.

La deuxième partie du travail a porté sur l'efficacité de la SP en TPI chez les femmes enceintes à Anonkoua-kouté et Samo où le niveau de résistance à ce médicament est élevé.

Au total 420 participantes ont été incluses dans l'étude dont 208 et 212 respectivement dans le groupe TPI non contrôlé et TPI contrôlé.

La prévalence du petit poids de naissance, critère principal de jugement, était plus élevée dans le groupe TPI non contrôlé mais cette différence n'était pas statistiquement significative. Aucune différence significative n'a été observée dans les deux groupes au regard de l'anémie maternelle quelle que soit sa gravité, de l'infection palustre placentaire, du paludisme en cours de grossesse et à la délivrance, de la prématurité, de l'avortement spontané et des morts nés.

Ces résultats montrent que le TPI avec la SP demeure efficace à Anonkoua-kouté et à Samo malgré la forte résistance de *P. falciparum*.

Mais cette efficacité est relative étant donné l'utilisation concomitante de la MII et des dérivés de l'artémisinine dans les sites d'étude.

La dernière partie du travail s'est intéressée à l'efficacité des CTA dans le traitement du paludisme simple à *P.falciparum* chez les enfants de moins de 5 ans. En effet, les dérivés de l'artémisinine pourraient être une alternative à la SP. Nos travaux ont montré qu'après plus de dix ans d'utilisation dans notre pays, les dérivés de l'artémisinine en association demeurent encore efficaces. Cependant le retard de clairance parasitaire observé dans le bras AL chez un participant pourrait suggérer une baisse de sensibilité de l'AL faisant craindre une émergence probable de la résistance aux dérivés de l'artémisinine.

Ce travail a permis de générer d'importantes données cliniques et biologiques comparables à d'autres zones géographiques. Ces informations sont essentielles à la fois aux différentes unités de recherche qui travaillent en amont, mais aussi aux équipes d'intervention qui travaillent en aval, afin de suivre, contrôler et guider au mieux la lutte contre le paludisme, en particulier chez la femme enceinte.

PERSPECTIVES

Malgré l'efficacité du TPI en zones de forte résistance de *P. falciparum* à la SP de nouvelles stratégies doivent à présent être envisagées.

Le retard de clairance parasitaire observé chez l'un de nos patients suggère une baisse de sensibilité de l'AL.

Il est donc nécessaire et urgent au regard des données de notre étude de mener des études futures portant sur:

1. l'efficacité des CTA dans le traitement du paludisme simple à *P. falciparum* et en TPI chez la femme enceinte en Côte d'Ivoire.
2. l'identification d'un marqueur de résistance aux dérivés de l'artémisinine

3. l'étude de la corrélation entre simples et doubles mutants aux codons 51 et 59 du gène *pfdhfr* et phénotype « échec thérapeutique ».
4. le polymorphisme génétique des gènes *msh1*, *msh2* et *Glurp* chez les souches plasmodiales parasitant le placenta ; le sang veineux des mêmes femmes au cours de la grossesse et à l'accouchement et les souches des femmes non enceintes présentant un accès palustre.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adjei GO, Kurtzhals JA, Rodrigues OP, Alifrangis M, Hoegberg LCG, Kitcher ED, Badoe EV, Lamptey R and Goka BQ, 2008. Amodiaquine-artesunate vs artemether-lumefantrine for uncomplicated malaria in Ghanaian children: a randomized efficacy and safety trial with one year follow-up. *Malar J*, 7: 127.

Adjetey TAK, Nekouressi G, Menan EIH, 1997. Situation de la sensibilité de Plasmodium falciparum à quelques antipaludiques à Adzopé. *Malaria*, 6:24-27.

Akinleye SO, Falade CO, Ajayi IO, 2009. Knowledge and utilization of intermittent preventive treatment for malaria among pregnant women attending antenatal clinics in primary health care centers in rural southwest, Nigeria: a cross-sectional study. *BMC Pregnancy Childbirth*, 9: 28.

Alam MT, de Souza DK, Vinayak S, Griffing SM, Poe AC, Duah NO, Ghansah A, Asamoah K, Slutsker L, Wilson MD, Barnwell JW, Udhayakumar V, Koram KA, 2011. Selective sweeps and genetic lineages of *Plasmodium falciparum* drug -resistant alleles in Ghana. *J Infect Dis*; 203: 220-7.

Albrecht ED, Pepe GJ, 1990. Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy. *Endocr Rev*, 11: 124-150.

Alsat E, Evain-Brion D, 1998. Le placenta humain : neuf mois d'une intense activité encore méconnue. *Médecine thérapeutique / Pédiatrie*, 1: 509-516.

Alsat E, Guibourdenche J, Luton D, Frankenne F, Evain-Brion D, 1997. Human placental growth hormone. *Am J Obstet Gynecol*, 177: 1526-1534.

Ametchi KJO, 2004. Evaluation de l'efficacité de la chloroquine dans le traitement du paludisme simple à plasmodium falciparum chez les enfants de 6 à 59 mois à l'hôpital général d'Ayamé (protocole OMS de 14 jours). *Diplôme d'Etat de Doctorat en Médecine*, UFR/SM, Université de Cocody, 163 pages.

Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, Mollinedo R, Bockarie M, Mokili J, Mharakurwa S, French N, Whitworth J, Velez ID, Brockman AH, Nosten F, Ferreira MU, Day KP, 2000. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol*; 17: 1467-82.

Anderson TJ, Nair S, Nkhoma S, Williams JT, Imwong M, Yi P, Socheat D, Das D, Chotivanich K, Day NPJ, White NJ, Dondorp AM, 2010. High heritability of malaria parasite clearance rates indicates a genetic basis for artemisinin resistance in Western Cambodia. *J Infect Dis*, 201: 1326–1330.

Anderson TJ, Nair S, Qin H, Singlam S, Brockman A, Paiphun L, Nosten F, 2005. Are transporter genes other than the chloroquine resistance locus (pfert) and multidrug resistance gene (pfmdr) associated with antimalarial drug resistance? *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 2180-8.

Anonyme, 2008. Directives nationales de prise en charge du paludisme en Côte d'Ivoire. Ministère de la Santé et de l'hygiène publique/Programme National de Lutte contre le Paludisme, 27 pages.

Asenso-Okyere K, Chiang C, Thangata P, Andam K, Mekonne DA, 2011. Understanding the interaction between farm labor productivity, and health and nutrition: A survey of the evidence. *J Dev Agric Econ*, 3: 80-90.

Austin DJ, Anderson RM, 1999. Studies of antibiotic resistance within the patient, hospitals and the community using simple mathematical models. *Phil Trans R Soc Lond B*, 354: 721-738.

Avril M, Hathaway MJ, Srivastava A, Dechavanne S, Hommel M, Beeson JG, Smith JD, Gamain B, 2011. Antibodies to a Full-Length VAR2CSA Immunogen Are Broadly Strain-Transcendent but Do Not Cross-Inhibit Different Placental-Type Parasite Isolates. *PLoS ONE*, 6: e16622.

Aziken ME, Akubuo KK, Gharoro EP, 2011. Efficacy of intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine on placental parasitemia in pregnant women in midwestern Nigeria. *Int J Gynaecol Obstet.*; 112: 30-3.

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

Bacon DJ, Tang D, Salas C, Roncal N, Lucas C, Gerena L, Lorena, Tapia L, Llanos-Cuentas AA, Garcia C, Solari L, Kyle D, Magill AJ, 2009. Effects of Point Mutations in *Plasmodium falciparum* Dihydrofolate Reductase and Dihydropterate Synthase Genes on Clinical Outcomes and In Vitro Susceptibility to Sulfadoxine and Pyrimethamine. *PLoS ONE*, 4: e6762.

Badoe EV, Lamptey R, Goka BQ, 2008. Amodiaquine-artesunate vs artemether-lumefantrine for uncomplicated malaria in Ghanaian children: a randomized efficacy and safety trial with one year follow-up. *Malar J*, 7: 127.

Banning TP, Heard CM, 2002. Binding of doxycycline to keratin, melanin and human epidermal tissue. *Int J Pharm*, 235, 219-27.

Basco LK, Eldin De Pecoulas P, Wilson CM, Le Bras J, Mazabraud A, 1995. Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene and pyrimethamine and cycloguanil resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 69, 135-8.

Beavogui AH, Djimde AA, Gregson A, Toure AM, Dao D, Coulibaly B, Ouologuem D, Fofana B, Sacko A, Tekete M, Kone A, Niare O, Wele M, Plowe CV, Picot S, Doumbo K, 2010. Low infectivity of *Plasmodium falciparum* gametocytes to *Anopheles gambiae* following treatment with sulfadoxine–pyrimethamine in Mali. *Int J Parasitol*, 40: 1213–1220.

Beeson JG, Mann EJ, Byrne TJ, Caragounis A, Elliott SR, Brown GV, Rogerson SJ, 2006. Antigenic Differences and Conservation among Placental *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes and Acquisition of Variant-Specific and Cross-Reactive Antibodies. *J Infect Dis*, 193: 721–730.

Bennett TN, Patel J, Ferdig MT, Roepe PD, 2007. *Plasmodium falciparum* Na⁺/H⁺ exchanger activity and quinine resistance. *Mol Biochem Parasitol*, 153, 48-58.

Berman JD, Nielsen R, Chulay JD, Dowler M, Kain KC, Kester KE, Williams J, Whelen AC, Shmuklarsky MJ, 2001. Causal prophylactic efficacy of atovaquone-proguanil (Malarone) in a human challenge model. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 95, 429-32.

Bertin G, Briand V, Bonaventure D, Carrieu A, Massougbodji A, Cot M, Deloron P, 2011. Molecular markers of resistance to sulphadoxine-pyrimethamine during intermittent preventive treatment of pregnant women in Benin. *Malar J*, 10: 196.

Bethell D, Se Y, Lon C, Tyner S, Saunders D, Sriwichai S, Darapiseth S, Teja-Isavadharm P, Khemawoot P, Schaecher K, Ruttvisutinunt W, Lin J, Kuntawungin W, Gosi P, Timmermans A, Smith B, Socheat D, Fukuda MM, 2011. Artesunate Dose Escalation for the Treatment of Uncomplicated Malaria in a Region of Reported Artemisinin Resistance: A Randomized Clinical Trial. *PLoS ONE*, 6: e19283.

Biswas S, 2004. Associations of antifolate resistance in vitro and point mutations in dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes of *Plasmodium falciparum*. *J Postgrad Med*, 50: 17-20.

Bioland PB, 2001. *Drug resistance in malaria*. WHO/CDS/CSR/DRS Geneva, Switzerland, 32 pages.

Bogreau H, Renaud F, Bouchiba H, Durand P, Assi S, Henry M, Garnotel E, Pradines B, Fusai T, Wade B, Adehossi E, Parola P, Kamil MA, Puijalon O, Rogier C, 2006. Genetic diversity and structure of african *Plasmodium falciparum* populations in urban and rural areas. *Am J Trop Med Hyg*, 74: 953-959.

Bogitsh JB, Cheng CT, 1998. General characteristics of the Protozoa. In: 2ND (ed.) *Human Parasitology*. 2nd ed. California: Academic Press.

Bourgeade A, Delmont J, 1998. The proper use of antimalarial drugs currently available. *Bull Soc Pathol Exot*, 91, 493-6.

Bouyou-Akotet MK, Mawili-Mboumba DP, Tchantchou T D, Kombila M, 2010a. High prevalence of sulfadoxine/pyrimethamine-resistant alleles of *Plasmodium falciparum* isolates in pregnant women at the time of introduction of intermittent preventive treatment with sulfadoxine/pyrimethamine in Gabon. *J Antimicrob Chemother*, 65: 438-41.

Bouyou-Akotet MK, Nzenze-Afene S, Ngoungou EB, Kendjo E, Owono-Medang M, Lekana-Douki JB, Obono-Obiang G, Mounanga M, Kombila M, 2010b. Burden of malaria during pregnancy at the time of IPTp/SP implementation in Gabon. *Am J Trop Med Hyg*, 82: 202-9.

Brabin BJ, Romagosa C, Abdelgalil S, Menendez C, Verhoeff FH, McGready R, Fletcher KA, Owens S, D'Alessandro U, Nosten F, Fischer PR & Ordi J, 2004. The sick placenta-the role of malaria. *Placenta*, 25: 359-378.

Brasseur P, Agnamey P, Gaye O, Vaillant M, Taylor WR, Olliaro PL, 2007. Efficacy and safety of artesunate plus amodiaquine in routine use for the treatment of uncomplicated malaria in Casamance, southern Sénégal. *Malar J*, 6:150.

Bray PG, Mungthin M, Ridley RG, Ward SA, 1998. Access to hematin: the basis of chloroquine resistance. *Mol Pharmacol*, 54: 170-179.

Briand V, Bottero J, Noël H, Masse V, Cordel H, Guerra J, Kossou H, Fayomi B, Ayemonna P, Fievet N, Massougbodji A, Cot M, 2009. Intermittent treatment for the prevention of malaria during pregnancy in Benin: a randomized, open-label equivalence trial comparing sulfadoxine-pyrimethamine with mefloquine. *J Infect Dis*, 200: 991-1001.

Briand V, Denoeud L, Massougbodji A, Cot M, 2008. Efficacy of intermittent preventive treatment versus chloroquine prophylaxis to prevent malaria during pregnancy in Benin. *J Infect Dis*.198: 594–601.

Bridges DJ, Molyneu M, Nkhoma S, 2009. Low level genotypic chloroquine resistance near Malawi's northern border with Tanzania, *Trop Med Int Health* 14: 1093-1096.

Briolant S, Pelleau S, Bogreau H, Hovette P, Zettor A, Castello J, Baret E, Amalvict R, Rogier C, Pradines B, 2011. In vitro susceptibility to quinine and microsatellite variations of the Plasmodium falciparum Na⁺/H⁺ exchanger (Pfnhe-1) gene: the absence of association in clinical isolates from the Republic of Congo. *Malar J*, 10:37.

Bruce-Chawatt LJ, 1952. Malaria in African infants and children in southern Nigeria. *Ann Trop Med Parasitol*, 46: 173-200.

Carrara VI , Zwang J , Ashley AA , Price RN , Stepniewska K , Brends M , Brockman A, Anderson T , McGready R , Phaiphun L , Proux S , van Vugt M , Hutagalung R , Lwin KM , Phyo AP , Preechapornkul P , Imwong M , Pukrittayakamee S , Singhasivanon P , White NJ , Nosten F, 2009 . Changes in the treatment responses to artesunate-mefloquine on the northwestern border of Thailand during 13 years of continuous deployment . *PLoS ONE*, 4: e4551.

Cerutti C Jr, Durlacher RR, de Alencar FE, Segurado AA, Pang LW, 1999. *In vivo* efficacy of mefloquine for the treatment of *falciparum* malaria in Brazil. *J Infect Dis*, 180: 2077-2080.

Chavchich M, Gerena L, Peters J, Chen N, Cheng Q, Kyle DE, 2010. Role of *pfmdr1* amplification and expression in induction of resistance to artemisinin derivatives in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*, 54: 2455-64.

Chen N, Kyle DE, Pasay C, Fowler EV, Baker J, Peters JM, Cheng Q, 2003. *pfert* allelic types with two novel amino acid mutations in chloroquino-resistant *Plasmodium falciparum* isolates from the Philippines. *Antimicrob Agents Chemother*, 47: 3500-3505.

Chinappi M, Via A, Marcatili P, Tramontano A, 2010. On the mechanism of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *PLoS One*, 5: e14064.

Chiodini PL, Conlon CP, Hutchinson DB, Farquhar JA, Hall AP, Peto TE, Birley H, Warrell DA, 1995. Evaluation of atovaquone in the treatment of patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *J Antimicrob Chemother*, 36, 1073-8.

Clark HC, 1915. The diagnostic value of the placental blood film in aestivo-autumnal malaria. *J Exp Med*, 22: 427-444.

Clyde DF & Shute GT, 1957. Resistance of *Plasmodium falciparum* in Tanganyika to pyrimethamine administered at weekly intervals. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 51: 505-513.

Colin JP, Kouamé G, Soro D, 2007. Outside the autochthon-migrant configuration. Access to land, land conflicts and inter-ethnic relationships in a former pioneer area (Lower Côte d'Ivoire). *The Journal of Modern African Studies*, 45: 33-59.

Conway DJ, Roper C, Oduola AMJ, Arnot DE, Kremsner PG, Grobusch MP, Curtis CF, Brian M. Greenwood BM, 1999. High recombination rate in natural populations of *Plasmodium falciparum*. *Proc Nat Acad Sci Usa*, 96 , 4506-4511.

Cortese JF, Caraballo A, Contreras CE, Plowe CV, 2002. Origin and dissemination of *Plasmodium falciparum* drug-resistance mutations in South America. *J Infect Dis*;186: 999-1006.

Cot M, Le Hesran JY, Staalsoe T, Fievet N, Hviid L, Deloron P, 2003. Maternally transmitted antibodies to pregnancy-associated variant antigens on the surface of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*: relation to child susceptibility to malaria. *Am J Epidemiol*, 157: 203-9.

Covell G, 1950. Congenital malaria. *Trop Dis Bull*, 47: 1147-1167.

Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, RatnamS, Rahman HA, Conway DJ, Singh B, 2008. Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis*, 46, 165-71.

Crocker IP, Tanner OM, Myers JE, Bulmer JN, Walraven G, Baker PN, 2004. Syncytiotrophoblast degradation and the pathophysiology of the malaria-infected placenta. *Placenta*, 25: 273-282.

Davies CS, Pudney M, Nicholas JC, Sinden RE, 1993. The novel hydroxynaphthoquinone 566C80 inhibits the development of liver stages of *Plasmodium berghei* cultured in vitro. *Parasitology*, 106 (Pt 1), 1-6.

Dellicour S, Tatem AJ, Guerra CA, Snow RW, ter Kuile FO, 2010. Quantifying the Number of Pregnancies at Risk of Malaria in 2007: A Demographic Study. *PLoS Med* 7: e1000221.

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

Deloron P, Bertin G, Briand V, Massougbojji, Cot M, 2010. Sulfadoxine/Pyrimethamine Intermittent Preventive Treatment for Malaria during Pregnancy. *Emerging Inf Dis*, 16: 1666-70.

Desai M, Ter Kuile FO, Nosten F, McGready R, Asamo K, Brabin B, Newman D, 2007. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis*, 7: 93-104.

Dicko A, Sagara I, Djimdé A, Touré SO, Traore M, Dama S, Diallo AI, Barry A, Dicko M, Coulibaly OM, Rogier C, Sousa A, Doumbo OK, 2010. Molecular markers of resistance to sulphadoxine-pyrimethamine one year after implementation of intermittent preventive treatment of malaria in infants in Mali. *Malar J*, 9: 9.

Djaman J, 2003. Évaluation de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* à différents antipaludiques (chloroquine, sulfadoxine-pyriméthamine, quinine) et profil génétique des isolats correspondants. *These Universite Paris XII*, 137 pages

Djaman J, Ahibo H, FYapi FH, Bla BK, Ouattara L, Yavo W, N'guessan JD, Yapo A, Mazabraud A, 2010. Molecular Monitoring of *Falciparaum* Malaria Isolates in Côte d'Ivoire: Genetic Markers (*dhfr-ts, dhps, pfert, pfmdr-1*) for Antimalarial-Drugs Resistance. *Eur J Sci Res*, 40: 46-470.

Djaman J, Bla BK, Yavo W, Yapi HF, Mazabraud A, Basco LK, 2007. Polymorphism of Pfert and Pfmdr-1 Genes of *Plasmodium falciparum* and chloroquine Susceptibility in Côte d'Ivoire. *Acta. Protozool.* 46: 361-365.

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

Dondorp AM, Yeung S, White L, Nguon C, Day NPJ, Socheat D and von S Lorenz, 2010. Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. *Nat Rev Microbiol.* 8: 272-80.

Dorsey, G., S. Staedke, T. D. Clark, D. Njama-Meya, B. Nzarubara, C. Maiteki-Sebuguzi, C. Dokomajilar, M. R. Kamya, and Rosenthal PJ, 2007. Combination therapy for uncomplicated falciparum malaria in Ugandachildren: a randomized trial. *JAMA*; 297: 2210–2219.

Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D, Crow JF, 1998. Rates of spontaneous mutation. *Genetics*, 148: 1667- 1686.

Duffy PE, 2007. *Plasmodium* in the placenta: parasites, parity, protection, prevention and possibly preeclampsia. *Parasitology*, 134: 1877-81.

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

Enosse S, Magnussen P, Abacassamo F, Gómez-Olivé X, Rønn AM, Thompson R, Alifrangis M, 2008. Rapid increase of *Plasmodium falciparum* dhfr/dhps resistant haplotypes, after the adoption of sulphadoxinepyrimethamine as first-line treatment in 2002, in southern Mozambique. *Malar J*, 7:115.

Enserink M, 2010. Malaria's drug miracle in danger. *Science*, 328: 844-846.

Eshetu T, Berens-Riha N, Fekadu S, Tadesse Z, Gürkov R, Hölscher M, Löscher T, Miranda IB, 2010. Different mutation patterns of *Plasmodium falciparum* among patients in Jimma University Hospital, Ethiopia. *Malar J*, 9: 226.

Farnet A, Lindberg J, Gil P, Swedberg G, Berqvist Y, Thapar MM, Lindegardh N, Berezcky S, Bjorkman A, 2003. Evidence of *Plasmodium falciparum* malaria resistant to atovaquone and proguanil hydrochloride: case reports. *Bmj*, 326, 628-9.

Faucher JF, Binder R, Missinou MA, Matsiegui PB, Gruss H, Neubauer R, Lell B, Que JU, Miller GB, Kremsner PG, 2002. Efficacy of atovaquone/proguanil for malaria prophylaxis in children and its effect on the immunogenicity of live oral typhoid and cholera vaccines. *Clin Infect Dis*, 35, 1147-54.

Faye B, Offianan AT, Ndiaye JL, Tine RC, Touré W, Djoman K, Sylla K, Ndiaye PS, Penali L, Gaye O, 2010. Efficacy and tolerability of artesunate-amodiaquine (Camoquin plus) versus artemether-lumefantrine (Coartem) against uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: multisite trial in Senegal and Ivory Coast. *Trop Med Int Health*, 15: 608-13.

Feng G, Aitken E, Yosaatmadja F, Kalilani L, Meshnick SR, Jaworowski A, Simpson JA, Rogerson SJ, 2009. Antibodies to variant surface antigens of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes are associated with protection from treatment failure and the development of anemia in pregnancy. *J Infect Dis*, 200: 299-306.

Feng G, Simpson JA, Chaluluka E, Molyneux ME, Rogerson SJ, 2010. Decreasing Burden of Malaria in Pregnancy in Malawian Women and Its Relationship to Use of Intermittent Preventive Therapy or Bed Nets. *PLoS ONE*, 5: e12012.

Ferdig MT, Cooper RA, Mu J, Deng B, Joy DA, Su XZ, Wellem, TE, 2004. Dissecting the loci of low-level quinine resistance in malaria parasites. *Mol Microbiol*, 52, 985-97.

Ferdig MT, Su X-Z, 2000. Microsatellite markers and genetic mapping in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today*, 16: 307-312.

Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, Ursos LM, Sidhu ABS, Naude B, Deitsch K, Su XZ, Wootton JC, Roepe PD, Wellem, TE, 2000. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell*, 6: 861-71.

Figueiredo P, Benchimo C, Lopes D, Bernardino L, E do Rosário V, Varanda L., Nogueira F, 2008. Prevalence of *pfmdr1*, *pfert*, *pfdhfr* and *pfdhps* mutations associated with drug resistance, in Luanda, Angola. *Malar J*, 7: 236.

Filler SJ, Kazembe P, Thigpen M, Macheso A, Parise ME, Newman RD, Steketee RW, Hamel M, 2006. Randomized trial of 2-dose versus monthly sulfadoxine-pyrimethamine intermittent preventive treatment for malaria in HIV-positive and HIV-negative pregnant women in Malawi. *J Infect Dis*, 194: 286-293.

Fontanet AL, Johnston DB, Walker AM, Rooney W, Thimasarn K, Sturchler D, McDonald M, Hours M, Wirth DF, 1993. High prevalence of mefloquine-resistant *falciparum* malaria in Eastern Thailand. *Bull WHO*, 71: 377-383.

Fried M & Duffy PE, 1998. Maternal antibodies block malaria. *Nature* 395: 851-852.

Frosch AE, Venkatesan M, Laufer MK, 2011. Patterns of chloroquine use and resistance in sub-Saharan Africa: a systematic review of household survey and molecular data. *Malar J*, 10: 116.

Gbotosho GO, Sowunmi A, Happi CT, and Okuboyejo TM, 2011. Therapeutic Efficacies of Artemisinin-Based Combination Therapies in Nigerian Children with Uncomplicated Falciparum Malaria during Five Years of Adoption as First-Line Treatments. *Am J Trop Med Hyg*, 84: 936–943.

Gentilini M, 1993. Maladies parasitaires : paludisme Médecine tropicale, Flammarion, médecine/sciences. Paris 5^{ème} tirage actualisé: 91-122.

Gesase S, Gosling RD, Hashim R, Ord R, Naidoo I, Madebe R, Mosha JF, Joho A, Mandia V, Mrema H, Mapunda E, Savael Z, Lemnge M, Mosha FW, Greenwood B, Roper C, Chandramohan D, 2009. High Resistance of *Plasmodium falciparum* to Sulphadoxine/Pyrimethamine in Northern Tanzania and the Emergence of dhps Resistance Mutation at Codon 581. *PLoS ONE* 4: e4569.

Giboda M & Denis MB, 1988. Response of Kampuchean strains of *Plasmodium falciparum* to antimalarials: *in vivo* assessment of quinine and quinine plus tetracycline; multiple drug resistance *in vitro*. *J Trop Med Hyg*, 91: 205-211.

Gies S, Coulibaly SO, Ouattara FT, Alessandro U, 2009. Individual efficacy of intermittent preventive treatment with sulfadoxine–pyrimethamine in primi- and secundigravidae in rural Burkina Faso: impact on parasitaemia, anaemia and birth weight. *Trop Med Int Health*, 14: 174-182.

Gnidehou S, Jessen L, Gangnard S, Ermont C, Triqui C, Quiviger M, Guitard J, Lund O, Deloron P, Nda TN, 2010. Insight into Antigenic Diversity of VAR2CSA-DBL5e Domain from Multiple *Plasmodium falciparum* Placental Isolates. *PLoS ONE* 5: e13105.

Goodman C, Brieger B, Unwin A, Mills A, Meek S, Greer G, 2007. Medicine Sellers and Malaria Treatment in Sub-Saharan Africa: What Do They Do and How Can Their Practice Be Improved? *Am J Trop Med Hy*, 77: 203-218.

Granado S, Obrist B, Manderson Land Tanner M, 2009. The moment of sale: Treating malaria in Abidjan, Côte d'Ivoire. *Anthropology & Medicine*, 16: 319-331.

Guitard J, Andersen P, Ermont C, Gnidehou S, Fievet N, Lund O, Deloron P, Ndam NT, 2010; *Plasmodium falciparum* population dynamics in a cohort of pregnant women in Senegal. *Malar J*, 9: 165.

Guitard J, Cottrell G, Magnouha NM, Salanti A, Li T, Sow S, Deloron P, Tuikue Ndam N, 2008. Differential evolution of anti-*VAR2CSA*- IgG3 in primigravidae and multigravidae pregnant women infected by *Plasmodium falciparum*. *Malar J*, 7: 10.

Guyatt HL, Noor AM, Ochola SA, Snow RW, 2004. Use of intermittent presumptive treatment and insecticide treated bed nets by pregnant women in four Kenyan districts. *Trop Med Inter Health*, 9: 255-261.

Hallett RL, Dunyo S, Ord R, Jawara M, Pinder M, Randall A, Allouche A, Walraven G, Targett GA, Alexander N, Sutherland CJ, 2006. Chloroquine/ sulphadoxine-pyrimethamine for Gambian children with malaria: Transmission to mosquitoes of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum*. *PLoS Clin Trials*, 1: e15.

Hamel MJ, Greene C, Chiller T, Ouma P, Polyak C, Otieno K, Williamson J, Shi YP, Feikin DR, Marston B, Brooks JT, Poe A, Zhou Z, Ochieng B, Mintz E, Slutsker L, 2008. Does cotrimoxazole prophylaxis for the prevention of HIV-associated opportunistic infections select for resistant pathogens in Kenyan adults? *Am J Trop Med Hyg*, 79: 320-330.

Hamer DH, Singh MP, Wylie BJ, Yeboah- Antwi K, Tuchman J, Desai M, Udhayakumar V, Gupta P, Brooks MI, Shukla MM, Awasthy K, Sabin L, MacLeod WB, Dash AP, Singh N, 2009. Burden of malaria in pregnancy in Jharkhand State, India. *Malar J*, 8: 210.

Harinasuta T, Bunnag D, Lasserre R, 1990. Quinine resistant *falciparum* malaria treated with mefloquine. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 21:552-557.

Harrington WE, Mutabingwaa TK, Muehlenbachs A, Sorensen B, Bollaa MC, Frieda M, Duffy PE, 2009. Competitive facilitation of drug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria parasites in pregnant women who receive preventive treatment. *PNAS*, 106: 9027-9032.

Hastings IM, 1997. A model for the origins and spread of drug-resistant malaria. *Parasitology*, 115: 133-141.

Hastings IM, Donnelly MJ, 2005. The impact of antimalarial drug resistance mutations on parasite fitness, and its implications for the evolution of resistance. *Drug Resist Updat*, 8: 43-50.

Hastings IM, Mackinnon MJ, 1998. The emergence of drugresistant malaria. *Parasitology*, 117: 411-417.

Henry M, Diallo I, Bordes J, Ka S, Prandines B, Diatta B, M'Baye PS, Sane M, Thiam M, Gueye PM, Wade B, Touze JE, Debonne JM, Rogier C, Fusai T, 2006. Urban malaria in Dakar, Senegal: chemosusceptibility and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates. *Am J Trop Med Hyg*, 75, 146-51.

Henry MC, Niangue MC, Kone M, 2002. Quel médicament pour traiter le paludisme simple quand la chloroquine devient inefficace dans l'ouest de la Côte d'Ivoire. *Méd Trop*, 62: 55-57.

Hogh B, Gamage-Mendis A, Butcher GA, Thompson R, Begtrup K, Mendis C, Enosse SM, Dgedge M, Barreto J, Eling W, Sinden RE, 1998. The differing impact of chloroquine and pyrimethamine/sulfadoxine upon the infectivity of malaria species to the mosquito vector. *Am J Trop Med Hyg*, 58: 176-182.

Hommel M, Elliott SR, Soma V, Kelly G, Fowkes FJ, Chesson JM, Duffy MF, Bockhorst J, Avril M, Mueller I, Raiko A, Stanicic DI, Rogerson SJ, Smith JD, Beeson JG, 2010. Evaluation of the antigenic diversity of placenta-binding *Plasmodium falciparum* variants and the antibody repertoire among pregnant women. *Infect Immun*, 78: 1963-78.

Hudson AT, Dickins M, Ginger CD, Gutteridge WE, Holdich T, Hutchinson DB, Pudney M, Randall AW, Latter VS, 1991. 566C80: a potent broad spectrum anti-infective agent with activity against malaria and opportunistic infections in AIDS patients. *Drugs Exp Clin Res*, 17, 427-35.

Hudson AT, Randall AW, Fry M, Ginger CD, Hill B, Latter VS, Mchardy N, Williams RB, 1985. Novel anti-malarial hydroxynaphthoquinones with potent broad spectrum anti-protozoal activity. *Parasitology*, 90 (Pt 1), 45-55.

Hughes WT, Gray VL, Gutteridge WE, Latter VS, Pudney M, 1990. Efficacy of a hydroxynaphthoquinone, 566C80, in experimental *Pneumocystis carinii* pneumonitis. *Antimicrob Agents Chemother*, 34, 225-8.

Hurwitz ES, Johnson D, Campbell CC, 1981. Resistance of *Plasmodium falciparum* malaria to sulfadoxine-pyrimethamine ('Fansidar') in a refugee camp in Thailand. *Lancet*, 1: 1068-1070.

Huynh BT, Fievet N , Gbaguidi G , Dechavanne S, Borgella S, Guézo-Mévo B, Massougboji A ,Tuikue Ndam N, Deloron P, Cot M, 2011. Influence of the Timing of Malaria Infection during Pregnancy on Birth Weight and on Maternal Anemia in Benin. *Am J Trop Med Hyg*, 85: 214–220.

Hviid L, 2010. The role of *Plasmodium falciparum* variant surface antigens in protective immunity and vaccine development. *Hum Vaccin*, 6: 84-9.

Hviid L, 2006. Paludisme chez la femme enceinte. *Med Trop*, 66 : 130-132.

Ibrahim ML, Hassane H, Konate L, Adamou S, Ousmane L, Adehossi E, Jeanne I, Duchemin JB , 2008. Réseau de surveillance moléculaire de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine et à la pyriméthanine dans la vallée du fleuve Niger, au Niger. *Bull Soc Pathol Exot*, 101 : 47-49.

Ittarat I, Webster HK, Yuthavong Y, 1992. High-performance liquid chromatographic determination of dihydroorotate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum* and effects of antimalarials on enzyme activity. *J Chromatogr*, 582, 57-64.

Iyer JK, Milhous WK, Cortese JF, Kublin JG, Plowe CV, 2001. *Plasmodium falciparum* cross-resistance between trimethoprim and pyrimethamine. *Lancet*, 358: 1066-7.

Jakobsen PH, Rasheed FN, Bulmer JN, Theisen M, Ridley RG& Greenwood BM, 1998. Inflammatory reactions in placental blood of *Plasmodium falciparum*-infected women and high concentrations of soluble E-selectin and a circulating *P. falciparum* protein in the cord sera. *Immunol*, 93: 264-269.

Jambou F, Legrand E, Niang M, Kim N, Lim P and al, 2005. Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artémether and point mutations of SERCA-type Pf ATPase 6. *Lancet*, 366: 1960-1963.

Jansen FH, 2011. Intermittent preventive therapy for malaria: arguments in favour of artesunate and sulphamethoxypyrazine – pyrimethamine combination. *Malar J*, 10: 70.

Jelinek T, Schelbert P, Loscher T, Eichenlaub D, 1995. Quinine resistant falciparum malaria acquired in east Africa. *Trop Med Parasitol*, 46:38-40.

Jiang H, Joy DA, Furuya T, Su XZ, 2006. Current understanding of the molecular basis of chloroquine-resistance in Plasmodium falciparum. *J Postgrad Med*, 52, 271-6.

Kabanywany AM, MacArthur JR, Stolk WA, Habbema JDF, Mshinda H, Bloland PB, Salim Abdulla S, Kachur PS, 2008. Malaria in pregnant women in an area with sustained high coverage of insecticide-treated bed nets. *Malar J*, 7: 133.

Kabanywany AM, Mwita A, Sumari D, Mandike R, Mugittu K, Abdulla S, 2007. Efficacy and safety of artemisinin-based antimalarial in the treatment of uncomplicated malaria in children in southern Tanzania. *Malar J*, 6: 146.

Kabyemela ER, Muehlenbachs A, Fried M, Kurtis JD, Mutabingwa TK, Duffy PE, 2008. Maternal peripheral blood level of IL-10 as a marker for inflammatory placental malaria. *Malar J*, 7: 26.

Kalanda GC, Hill J, Verhoeff FH, Brabin BJ, 2006. Comparative efficacy of chloroquine and sulphadoxine–pyrimethamine in pregnant women and children: a meta-analysis. *Trop Med Int Health*, 11: 569-77.

Kanya MR, Yeka A, Bukirwa H, Lugeswa M, Rwakimari JB, Staedke SG, Talisuna AO, Greenhouse B, Nosten F, Rosenthal PJ, Wabwire-Mangen F, Dorsey G, 2007. Artemether-lumefantrine versus dihydroartemisinin-piperaquine for treatment of malaria: a randomized trial. *PLoS Clin Trials*, 2: e20.

Kaufmann P, Burton G, 1994. Anatomy and genesis of the placenta. In : Knobil E, Neill JD, eds. *The physiology of reproduction*. New York : Raven Press, 441-484

Kim N, Bouchier C, Ekala MT, Mercereau-Puijalon O, Fandeur T, 2004. Polymorphisme et chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* au cambodge. *Med Mal Infect* 34 : 61–64.

Kobbe R, Klein P, Adjei S, Amemasor S, Thompson WN, Heidemann H, Nielsen MV, Vohwinkel J, Hogan B, Kreuels B, Bührlen M, Loag W, Ansong D and May J, 2008. A randomized trial on effectiveness of artemether-lumefantrine *versus* artesunate plus amodiaquine for unsupervised treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Ghanaian children. *Malar J*, 7: 261.

Koella JC & Antia R, 2003. Epidemiological models for the spread of anti-malarial resistance. *Malar J*, 2: 3.

Kone A, van de Vegte-Bolmer M, Siebelink-Stoter R, van Gemert G, Dara A, Niangaly H, Luty A, Doumbo K, Sauerwein R, Djimde AA, 2010. Sulfadoxine–pyrimethamine impairs *Plasmodium falciparum* gametocyte infectivity and *Anopheles* mosquito survival. *Int J Parasito*, 40: 1221–1228

Koram KA, Abuaku B, Duah N, Quashie N, 2005. Comparative efficacy of antimalarial drugs including ACTs in the treatment of uncomplicated malaria among children under 5 years in Ghana. *Acta Trop*, 95: 194-203.

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

Krishna S, Uhlemann AC, Haynes RK, 2004. Artemisinins: mechanisms of action and potential for resistance. *Drug Resist Updat*, 7: 233-44.

Krishna S, White NJ, 1996. Pharmacokinetics of quinine, chloroquine and amodiaquine. Clinical implications. *Clin Pharmacokinet*, 30: 263–99.

Kublin JG, Cortese JF, Njunju EM, Mukadam AG, Wirima JJ, Kazembe PN, Djimde AA, Kouriba B, Taylor TE, Plowe CV, 2003. Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. *J Infect Dis*, 187: 1870-1875.

Lala PK, Hamilton GS, 1996. Growth factors, proteases and protease inhibitors in the maternal-fetal dialogue. *Placenta*, 17: 545-555.

Laufer MK, Djimdé AA, Plowe CV, 2007. Monitoring and deterring drug-resistant malaria in the era of combination therapy. *Am J Trop Med Hyg*, 77: 160-169.

Laufer MK, Plowe CV, 2004. Withdrawing antimalarial drugs: impact on parasite resistance and implications for malaria treatment policies. *Drug Resist Updat*, 7: 279-288.

Laufer MK, Thesing PC, Eddington ND, Masonga R, Dzinjalama FK, Takala SL, Taylor TE, Plowe CV, 2006. Return of chloroquine antimalarial efficacy in Malawi. *N Engl J Med*, 355: 1959-1966.

Legris C, 2005. La détection des médicaments contrefaits par investigation de leur authenticité. Étude pilote sur le marché pharmaceutique illicite de Cote d'Ivoire. *Thèse université Henri Poincaré, Nancy I*.p163

Lehane AM, Kirk K, 2010. Efflux of a range of antimalarial drugs and 'chloroquine resistance reversers' from the digestive vacuole in malaria parasites with mutant PfCRT. *Mol Microbiol*, 77: 1039-1051.

Lekana-Douki JB, Boutamba SD, Zatra R, Edou SE, Ekomy H, Bisvigou U, Toure-Ndouo FS, 2011. Increased prevalence of the *Plasmodium falciparum* Pfmdr1 86N genotype among field isolates from Franceville, Gabon after replacement of chloroquine by artemether-lumefantrine and artesunate-mefloquine. *Infect Genet Evol*, 11: 512-7.

Le Port A, Cottrell G, Dechavanne C, Briand V, Bouraima A, Guerra J, Choudat I, Massougboji A, Fayomi B, Migot-Nabias F, Garcia A, and Cot M, 2011. Prevention of Malaria during Pregnancy: Assessing the Effect of the Distribution of IPTp Through the National Policy in Benin. *Am J Trop Med Hyg*, 84: 270-275.

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

Lim P, Chy S, Ariey F, Incardona S, Chim P, Sem R, Denis MB, Hewitt S, Hoyer S, Socheat D, Mercereau-Puijalon O, Fandeur T, 2003. *pfcr* polymorphism and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* strains isolated in Cambodia. *Antimicrob Agents Chemother*, 47: 87-94.

Lim DS, Triscott J, 2003. O'Brien's actinic granuloma in association with prolonged doxycycline phototoxicity. *Australas J Dermatol*, 44, 67-70.

Looareesuwan S, Viravan C, Webster HK, Kyle DE, Hutchinson DB, Canfield CJ, 1996. Clinical studies of atovaquone, alone or in combination with other antimalarial drugs, for treatment of acute uncomplicated malaria in Thailand. *Am J Trop Med Hyg*, 54, 62-6.

Luntamo M, Kulmala T, Mbewe B , Cheung BY, Maleta K, Ashorn P, 2010. Effect of Repeated Treatment of Pregnant Women with Sulfadoxine-Pyrimethamine and Azithromycin on Preterm Delivery in Malawi: A Randomized Controlled Trial. *Am J Trop Med Hyg*, 83: 1212-1220.

Luxemburger C, Thwai KL, White NJ, Webster HK, Kyle DE, Maelankirri L, Chongsuphajaisiddhi T, Nosten F, 1996. The epidemiology of malaria in a Karen population on the western border of Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 90: 105-111.

MacDonald SM, Bhisutthibhan J, Shapiro TA, Rogerson SJ, Taylor TE, Tembo M, Langdon JM, Meshnick SR, 2001. Immune mimicry in malaria: *Plasmodium falciparum* secretes a functional histamine-releasing factor homolog in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci*; 98: 10829-32.

Malisa AL, Pearce RJ, Abdulla S, Mshinda H, Kachur PS, Bloland P, Roper C, 2010. Drug coverage in treatment of malaria and the consequences for resistance evolution evidence from the use of sulphadoxine/pyrimethamine. *Malar J*, 9: 190.

Manyando C, Mkandawire R, Puma L, Sinkala M, Mpabalwani E, Njunju E, Gomes M, Ribeiro I, Walter V, Virtanen M, Schlienger R, Cousin M, Chipimo M, Sullivan FM, 2010. Safety of artemether-lumefantrine in pregnant women with malaria: results of a prospective cohort study in Zambia. *Malar J*, 9: 249.

Matthys B, Koudou Bg, N'goran EK, Vounatsou P, Gosoni L, Kone M, Cisse G, Utzinger J, 2010. Spatial dispersion and characterisation of mosquito breeding habitats in urban vegetable-production areas of Abidjan, Côte d'Ivoire. *Ann Trop Med Parasitol*, 104: 649–666.

Matthys B, Vounatsou P, Raso G, Tschannen AB, Becket EG, Gosoni L, Cissé G, Tanner M, N'Goran EK, Utzinger J, 2006. Urban farming and malaria risk factors in a medium-sized town in Côte d'Ivoire. *Am J Trop Med Hyg*, 75: 1223-31.

McCollum AM, Basco LK, Tahar R, Udhayakumar V, Escalante AA, 2008. Hitchhiking and selective sweeps of *Plasmodium falciparum* sulfadoxine and pyrimethamine resistance alleles in a population from central Africa. *Antimicrob Agents Chemother*, 52: 4089-4097.

McGready R, Tan SO, Ashley EA, Pimanpanarak M, Viladpai-Nguen J, Phaiphun L, Wüstefeld K, Barends M, Laochan N, Keereecharoen L, Lindegardh N, Singhasivanon P, White NJ, Nosten F, 2008. A randomised controlled trial of artemether-lumefantrine versus artesunate for uncomplicated *Plasmodium falciparum* treatment in pregnancy. *PLoS Med*, 5: e253.

Meissner PE, Mandi G, Mockenhaupt FP, Witte S, Coulibaly B, Mansmann U, Frey C, Merkle H, Burhenne J, Walter-Sack I, Müller O, 2008. Marked differences in the prevalence of chloroquine resistance between urban and rural communities in Burkina Faso. *Acta Trop*, 105: 81-86.

Mendez F, Munoz A, Carrasquilla G, Jurado D, Arevalo-Herrera M, Cortese JF, Plowe, CV, 2002. Determinants of treatment response to sulfadoxine– pyrimethamine and subsequent transmission potential in falciparum malaria. *Am J Epidemiol*, 156: 230-238.

Mendez F, Herrera S, Murrain B, Gutiérrez A, Moreno LA, Manzano M, Muñoz A, Plowe CV, 2007. Selection of antifolate-resistant *Plasmodium falciparum* by sulfadoxine– pyrimethamine treatment and infectivity to *Anopheles* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 77: 438-443.

Menendez C, Bardaji A, Sigauque B, Romagosa C, Sanz S, Serra-Casas E, Macete E, Berenguera A, David C, Doban C, Naniche D, Mayor A, Ordi J, Mandomando I, Aponte JJ, Mabunda S, Alonso PL, 2008. A randomized placebo controlled trial of intermittent preventive treatment in pregnant women in the context of insecticide treated nets delivered through the antenatal clinic. *PLoS ONE*, 3: e1934.

Menendez C, Bardaji A, Sigauque B, Sanz S, Aponte JJ, Mabunda S, Alonso PL, 2010. Malaria Prevention with IPTp during Pregnancy Reduces Neonatal Mortality. *PLoS ONE*, 5: e9438.

Menendez C, Serra-Casas E, Scahill MD, Sanz S, Nhabomba A, Bardaji A, Sigauque B, Cistero P, Mandomando I, Doban C, Alonso PL, Mayor A, 2011. HIV and Placental Infection Modulate the Appearance of Drug-Resistant *Plasmodium falciparum* in Pregnant Women who Receive Intermittent Preventive Treatment. *Clin Infect Dis*, 52: 41–48.

Merger R, Levy J, Melchior J, 1995. Précis d'obstétrique. *Edition 5 Masson*, 185: 20-32.

Mermin J, Lule J, Ekwaru JP, Downing R, Hughes P, Bunnell R, Malamba S, Ransom R, Kaharuza F, Coutinho A, Kigozi A, Quick R, 2005. Cotrimoxazole prophylaxis by HIV-infected persons in Uganda reduces morbidity and mortality among HIV-uninfected family members. *AIDS*, 19: 1035-42.

Mita T, 2010. Origins and spread of pfdhfr mutant alleles in *Plasmodium falciparum*. *Acta Trop*, 114: 166-70.

Mita T, Kazuyuti T, Takahashi N, Culleton R, Ndounga M, Dzodzomeyo M, Akhwale WS, Kaneko A, Takatoshi K, 2009a. In situ evolution of *Plasmodium falciparum* pyriméthamine resistance multiple times in Africa. *J Antimicrob Chemother*, 63: 252-255.

Mita T, Tanabe K, Kita K, 2009b. Spread and evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance. *Parasitol Int*, 58: 201-209.

MMV/Who: Methods and techniques for clinical trials on antimalarial drug efficacy: genotyping to identify parasite populations. Informal consultation organized by the Medicines for Malaria Venture and cosponsored by the World Health Organization. 29– 31 May 2007, Amsterdam, The Netherlands.
http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241596305_eng.pdf. (Consulté le 15 octobre 2010)

Mockenhaupt FP, Bedu-Addo G, Eggele TA, Hommerich L, Holmberg V, Von Oertzen C, Bienze U, 2008. Rapid increase in the prevalence of sulfadoxine-pyrimethamine resistance among *Plasmodium falciparum* isolated from pregnant women in Ghana. *J Infect Dis*, 198: 1545-1549.

Mockenhaupt FP, Bedu-Addo G, Gaertner CV, Boyé R, Fricke K, Hannibal I, Karakaya F, Schaller M, Ulmen U, Acquah PA, Dietz E, EggeleTA, Bienze U, 2006. Detection and clinical manifestation of placental malaria in southern Ghana. *Malar J*, 5:119.

Morris TJ, Davis TP, 2000. Doxycycline-induced esophageal ulceration in the U.S. Military service. *Mil Med*, 165, 316-9.

Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M, Julvez J, Mangui S, Richard-Lenoble D, Sircoulon J. Biodiversite du paludisme dans le monde. Paris: John Libbey Eurotext, 2004. 428 pages

Mtawa AP, Chisimba S, Sikalima IJ, Rouse P, Thuma PE and Mharakurwa S, 2008. Escalating *Plasmodium falciparum* antifolate drug resistance mutations in Macha, rural Zambia. *Malar J*. 7: 8.

Mu J, Ferdig MT, Feng X, Joy DA, Duan J, Furuya T, Subramanian G, Aravind L, Cooper RA, Wootton JC, Xiong M, Su XZ, 2003. Multiple transporters associated with malaria parasite responses to chloroquine and quinine. *Mol Microbiol*, 49, 977-89.

Mubyazi A, Bloch P, Kamugisha M, Kitua A, Ijumba J, 2005. Intermittent preventive treatment of malaria during pregnancy: a qualitative study of knowledge, attitudes and practices of district health managers, antenatal care staff and pregnant women in Korogwe district, North-Eastern Tanzania. *Malar J* 4:31.

Mutabingwa TK, Muze K, Ord R, Briceño M, Greenwood BM, Drakeley C, Whitty JM, 2009. Randomized trial of artesunate + amodiaquine, sulfadoxine-pyrimethamine + amodiaquine, chlorproguanil-dapsone and SP for malaria in pregnancy in Tanzania. *PLoS ONE*, 4: e5138.

Mutabingwa, TK, Anthony D, Heller A, Hallett R, Ahmed J, Drakeley C, Greenwood BM, Whitty CJ, 2005. Amodiaquine alone, amodiaquine+sulfadoxine-pyrimethamine, amodiaquine+artesunate, and artemether-lumefantrine for outpatient treatment of malaria in Tanzanian children: a four-arm randomised effectiveness trial. *Lancet*, 365: 1474-1480.

Ndiaye JL, Randrianarivelojosia M, Sagara I, Brasseur P, Ndiaye I, Faye B, Randrianasolo L, Ratsimbao A, Forlemu D, Moor VA, Traore A, Dicko Y, Dara N, Lameyre V, Diallo M, Djimde A, Same-Ekobo A and Gaye O, 2009. Randomized, multicentre assessment of the efficacy and safety of ASAQ – a fixed-dose artesunate-amodiaquine combination therapy in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar J*, 8: 125.

Newton PN, Fernández FM, Green MD, Primo-Carpenter J, White NJ, 2010. Counterfeit and substandard anti-infectives in developing countries. In Sosa AJ, Byarugada DK, Amabile-Cuevas CF, Okeke I, Kariuki S, Hsueh PR, editors. Antimicrobial resistance in developing countries. New York: *Springer* p 413-443.

Newton PN, Green MD, Mildenhall DC, Plancon A, Nettey H, Nyadong L, Hostetler DM, Swamidoss I, Harris GA, Powell K, Timmermans AE, Amin AA, Stephen K, Barbereau S, Faurant C, Soong RC, Faure K, Thevanayagam J, Fernandes P, Kaur H, Angus B, Stepniewska K, Guerin PJ, Fernandez FM, 2011. Poor quality vital anti-malarials in Africa - an urgent neglected public health Priority. *Malar J*, 10:352.

Nicoulet I, Simon F, Le Bras J, 1987. Apparition de la chloroquino résistance du paludisme à *Plasmodium falciparum* en Côte d'Ivoire. *Bull Epidemiol Hebd*, 47: 163.

Njagi JK, Magnussen P, Estambale B, Ouma J, Mugo B, 2003. Prevention of anaemia in pregnancy using insecticide-treated bednets and sulfadoxine- pyrimethamine in a highly malarious area of Kenya: a randomized controlled trial. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 97: 277–82.

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

Noedl H, Krudsood S, Chalermratana K, Silachamroon U, Leowattana W, Tangpukdee N, Looareesuwan S, Miller RS, Fukuda M, Jongsakul K, Sriwichai S, Rowan J, Bhattacharyya H, Oohet C, Knirsch C, 2006. Azithromycin combination therapy with artesunate or quinine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in adults: a randomized, phase 2 clinical trial in Thailand. *Clin Infect Dis*, 43, 1264-71.

Noedl H, Youry S, Douong S, Mark M F, 2008. Evidence of Artemisinin-resistant malaria in west Cambogia. *N Eng J Med*, 359: 2619-2620.

Nsoby SL, Kiggundu M, Nanyunja S, Joloba M, Greenhouse B, Rosenthal PJ, 2010. *In Vitro* Sensitivities of *Plasmodium falciparum* to Different Antimalarial Drugs in Uganda. *Antimicrob Agents Chemother*, 54: 1200-1206.

Oesterholt MJ, Alifrangis M, Sutherland CJ, Omar SA, Sawa P, Howitt C, Gouagna LC, Sauerwein RW, Bousema T, 2009. Submicroscopic gametocytes and the transmission of antifolate-resistant *Plasmodium falciparum* in Western Kenya. *PLoS One*, 4: e4364.

Offianan AT; Ako AA, LK Penali, Nogbou M, Tidjane, Gba B, Soumahoro A, Issiaka B, 2007. Efficacy of non-controlled Intermittent Preventive Treatment in Pregnant (IPTp) women in Côte d'Ivoire. *ASTMH 56th Annual Meeting*, November 4-8, Philadelphia, Pennsylvania USA.

Offianan AT, Menan GK, Yapi JD, Ako AAB, Khali D, Gomez OG, Penali LK, 2011. Artesunate/mefloquine paediatric formulation versus artemether/lumefantrine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* in Anonkoua kouté, Côte d'Ivoire. *Trop Med Int Health*, 16: 290–297.

Offianan AT, Penali LK, Yapi JD, Ako AB, Toure W, Djerea K, Gomez GO, Makaila O, 2009. A comparative, randomized clinical trial of artemisinin/naphthoquine twice daily one day *versus* artemether/lumefantrine six doses regimen in children and adults with uncomplicated falciparum malaria in Côte d'Ivoire. *Malar J*, 8: 148.

Ohrt C, Richie TL, Widjaja H, Shanks GD, Fitriadi J, Fryauff DJ, Handschin J, Tang D, Sandjaja B, Tjitra E, Hadiarso L, Watt G, Wignall FS, 1997. Mefloquine compared with doxycycline for the prophylaxis of malaria in Indonesian soldiers. A randomized, double-blind, placebocontrolled trial. *Ann Intern Med*, 126, 963-72.

Okoko BJ, Ota MOC, Yamuah KL, Nkpanam NE, Idiong D, Banya WAS, Avieka A, Osinusi K, 2002. Influence of maternal malaria infection on foetal outcome in The Gambia: 20 years after Ian McGregor. *J health Popul Nutr*, 20: 4-11.

Okombo J, Kiara SM, Rono J, Mwai L, Pole L, Ohuma E, Borrmann S, Ochola LI, Nzila A, 2010. *In Vitro* Activities of Quinine and Other Antimalarials and *pfpr* Polymorphisms in *Plasmodium* Isolates from Kenya. *Antimicrob Agents Chemother*, 54: 3302–3307.

OMS, 2011. Directives pour le traitement du paludisme -- 2e éd. http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789242547924_fre.pdf. Consulté le 28 août 2012

Olliaro P L, Haynes RK, Meunier B, Yuthavong Y, 2001. Possible modes of action of the artemisinin-type compounds. *Trends Parasitol*, 17: 122-126.

Onyamboko MA, Meshnick SR, Fleckenstein L, Koch MA, Atibu J, Lokomba V, Douoguih M, Hemingway-Foday J, Wesche D, Ryder RW, Bose C, Wright LL, Tshetu AK, Capparelli EV, 2011. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of artesunate and dihydroartemisinin following oral treatment in pregnant women with asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections in Kinshasa DRC. *Malar J*, 10: 49.

Ouattara L, Bla KB, Assi SB, , Yavo W, Djaman A, 2010. PFCRT and DHFR-TS Sequences for Monitoring Drug Resistance in Adzopé Area of Côte d'Ivoire After the Withdrawal of Chloroquine and Pyrimethamine. *Trop J Pharm Res*, 9: 565-572.

Owusu-Agyei S, Asante KP, Owusu R, Adjuik M, Amenga-Etego S, Dosoo DK, Gyapong J, Greenwood B, Chandramohan D, 2008. An open label, randomised trial of artesunate+amodiaquine, artesunate+ chlorproguanil-dapsone and artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated malaria. *PLoS ONE* , 3: e2530.

Paget-McNicol S, Saul A, 2001. Mutation rates in the dihydrofolate reductase gene of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*, 122: 497-505.

Palmieri F, Petrosillo N, Paglia MG, Conte A, Goletti D, Pucillo LP, Menegon M, Sannella A, Severini C, Majori G, 2004. Genetic confirmation of quinine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria followed by postmalaria neurological syndrome in a traveler from Mozambique. *J Clin Microbiol*, 42:5424-5426.

Pandey AV, Tekwani, Singh RL, Chauhan VS, 1999. Artemisinin, an endoperoxide antimalarial, disrupts the hemoglobin catabolism and heme detoxification. *J Biol Chem*, 2: 19383-8.

Penali LK, Berenger AA AKO, Offianan AT, Briceno M, Sibley CH, 2009. Two different distributions of *Pfprt*, *Pfdhfr* and *Pfdhps* haplotypes from neighbouring geographical site in southern Cote d'Ivoire. *ASTMH 58th Annual Meeting November 22–28*, Washington DC, USA.

Parola P, Pradines B, Simon F, Carlotti MP, Minodier P, Ranjeva MP, Badiaga S, Bertaux L, Delmont J, Morillon M, Silai R, Brouqui P, Parzy D, 2007. Antimalarial drug susceptibility and point mutations associated with drug resistance in 248 *Plasmodium falciparum* isolates imported from Comoros to Marseille, France in 2004 2006. *Am J Trop Med Hyg*, 77, 431-7.

Peters J, Chen N, Gatton M, Korsinczky M, Fowler EV, Manzetti S, Saul A, Cheng Q, 2002. Mutations in cytochrome b resulting in atovaquone resistance are associated with loss of fitness in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* , 46: 2435-2441.

Peters PJ, Thigpen MC, Parise ME, Newman RD, 2007. Safety and toxicity of sulfadoxine/pyrimethamine: implications for malaria prevention in pregnancy using intermittent preventive treatment. *Drug Saf*, 30: 481-501.

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

Pradines B, Hovette P, Fusai T, Atanda HL, Baret E, Cheval P, Mosnier J, Callec A, Cren J, Amalvict R, Gardair J P, Rogier C, 2006. Prevalence of in vitro resistance to eleven standard or new antimalarial drugs among Plasmodium falciparum isolates from Pointe-Noire, Republic of the Congo. *J Clin Microbiol*, 44, 2404-8.

Pukrittayakamee S, Chantira A, Vanijanonta S, Clemens R, Looreesuwan S, White NJ, 2000. Therapeutic responses to quinine and clindamycin in multidrug-resistant falciparum malaria. *Antimicrob Agents Chemother*, 44, 2395-8.

Randrianarivehojosa M, Randrianasolo L, Randremanan RV, Randriamanantena A, Ratsimbaoa A, Rakotoson JD, 2004. Susceptibility of Plasmodium falciparum to the drugs used to treat severe malaria (quinine) and to prevent malaria (mefloquine, cycloguanil) in Comoros Union and Madagascar. *S Afr Med J*, 94, 47-51.

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

Robert V, Awono-Ambene HP, Le Hesran JY, Trape JF, 2000. Gametocytemia and infectivity to mosquitoes of patients with uncomplicated Plasmodium falciparum malaria attacks treated with chloroquine or sulfadoxine plus pyrimethamine. *Am J Trop Med Hyg*, 62: 210-216.

Rogerson SJ, 2003. Sequestration: causes and consequences. *Redox Rep*, 8 (5): 295-299.

Rogerson SJ, Hviid L, Duffy PE, Leke RFG, Taylor DW, 2007. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *lancet infect Dis*, 7: 105-117.

Rowe JA, Kyes SA, 2004. The role of *Plasmodium falciparum* var genes in malaria in pregnancy. *Mol Microbiol*, 53: 1011–1019.

Salgueiro P, Vicente JL, Ferreira C, Teófilo V, Galvão A, Rosário VE, Cravo P and Pinto J, 2010. Tracing the origins and signatures of selection of antifolate resistance in island populations of *Plasmodium falciparum*. *BMC Infect Dis*, 10: 163.

Sanchez CP, Dave A, Stein WD, Lanzer M, 2010. Transporters as mediators of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol*, 40: 1109-1118.

Sander AF, Salanti A, Lavstsen T, Nielsen MA, Magistrado P, Lusingu J, Tuikue NN, Arnot DE, 2009. Multiple var2csa-Type PfEMP1 Genes Located at Different Chromosomal Loci Occur in Many *Plasmodium falciparum* Isolates. *PLoS ONE*, 4: e6667.

Sangare LR, Stergachis A, Brentlinger PE, Richardson BA, Staedke SG, Kiwuwa MS, Weiss NS, 2010. Determinants of Use of Intermittent Preventive Treatment of Malaria in Pregnancy: Jinja, Uganda. *PLoS ONE*, 5: e15066.

Sarr D, Marrama L, Gaye A, Dangou JM, Niang M, Mercereau-Puijalon O, Lehesran JY, and Jambou R, 2006. High prevalence of placental malaria and low birth weight in Sahelian periurban areas. *Am J Trop Med Hyg*, 75: 171-177.

Savage EJ, Msyamboza K, Gies S, D'Alessandro U, Brabin BJ, 2007. Maternal anaemia as an indicator for monitoring malaria control in pregnancy in sub-Saharan Africa. *BJOG*, 114: 1222-1231.

Shinondo CJ, Lanners HN, Lowrie RC Jr, Wiser MF, 1994. Effect of pyrimethamine resistance on sporogony in a *Plasmodium berghei*/*Anopheles stephensi* model. *Exp Parasitol*, 78: 194-202.

Sidhu ABS, Verdier-Pinard D, Fidock DA, 2002. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by *pfcr1* mutations. *Science*, 298: 210-213.

Simpson DC, Kabyemela E, Muehlenbachs A, Ogata Y, Mutabingwa TK, Duffy PE, Fried M, 2010. Plasma Levels of Apolipoprotein A1 in Malaria-Exposed Primigravidae Are Associated with Severe Anemia. *PLoS ONE*, 5: e8822.

Sirima SB, Cotte AH, Konate A, Moran AC, Asamoah K, Bougouma EC, Diarra A, Ouédraogo A, Parise ME, Newman RD, 2006. Malaria prevention during pregnancy: assessing the disease burden one year after implementing a program of intermittent preventive treatment in Koupela District, Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg*, 75: 205-211.

Sokhna C, Cisse B, Ba EH, Milligan P, Hallett R, Sutherland C, Gaye O, Boulanger D, Simondon K, Simondon F, Targett G, Lines J, Greenwood B, Trape JF, 2008. A trial of the efficacy, safety and impact on drug resistance of four drug regimens for seasonal intermittent preventive treatment for malaria in Senegalese children. *PLoS ONE* 3: e1471.

Somé AF, Séré YY, Dokomajilar C, Zongo I, Rouamba N, Greenhouse B, Ouédraogo JB, Rosenthal PJ, 2010. Selection of known *Plasmodium falciparum* resistance-mediating polymorphisms by artemether-lumefantrine and amodiaquine-sulfadoxine-pyrimethamine but not hydroartemisinin-piperaquine in Burkina Faso. *Antimicrob Agents Chemother*, 54: 1949-54.

Soulama I, Nébié I, Ouédraogo A, Gansane A, Diarra A, Tiono AB, Bougouma EC, Konaté AT, Kabré GB, Taylor WRJ, Sirima SB, 2009. *Plasmodium falciparum* genotypes diversity in symptomatic children living in an urban and a rural setting in Burkina Faso. *Malar J*, 8: 135.

Sowunmi A, Fateye BA, 2003. *Plasmodium falciparum* gametocytemia in Nigerian children: before, during and after treatment with antimalarial drugs. *Trop Med Int Health*, 8: 783-792.

Spalding MD, Eyase FL, Akala HM, Bedno SA, Prigge ST, Coldren RL, Moss WJ, Waters NC, 2010. Increased prevalence of the pfdhfr/phdhps quintuple mutant and rapid emergence of pfdhps resistance mutations at codons 581 and 613 in Kisumu, Kenya. *Malar J*, 9: 338.

Stepniewska K, Taylor WR, Mayxay M, Price R, Smithuis F, Guthmann JP, Barnes K, Myint HY, Adjuik M, Olliaro P, Pukrittayakamee S, Looareesuwan S, Hien TT, Farrar J, Nosten F, Day NP, White NJ, 2004. *In vivo* assessment of drug efficacy against *Plasmodium falciparum* malaria: duration of follow-up. *Antimicrob Agents Chemother*. 48: 4271-80.

Sridaran S, McClintock K, Syphard M, Herman H, Barnwell 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. *Malar J*, 9: 247.

Steketee RW, Nahlen BL, Parise ME, Menendez C, 2001. The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. *Am J Trop Med Hyg*, 64: 28-35.

Strickland S, Richards WG, 1992. Invasion of the trophoblasts. *Cell*, 71: 355-357.

Sutherland CJ, Fifer H, Pearce RJ, bin Reza F, Nicholas M, Haustein T, Njimgye-Tekumafor NE, Doherty JF, Gothard P, Polley SD, Chiodini PL, 2009. Novel *Pfdhps* Haplotypes among Imported Cases of *Plasmodium falciparum* Malaria in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother*, 53: 3405–3410.

Su XZ, Kirkman LA, Fujioka H, Wellems TE, 1997. Complex polymorphisms in a ~330 kDa protein are linked to chloroquine-resistant *P. falciparum* in Southeast Asia and Africa. *Cell*, 91: 593-603.

Tagbor H, Bruce J, Agbo M, Greenwood B, Chandramohan D, 2010. Intermittent Screening and Treatment versus Intermittent Preventive Treatment of Malaria in Pregnancy: A Randomised Controlled Non-Inferiority Trial. *PLoS ONE* 5: e14425.

Tagbor H, Bruce J, Ord R, Randall A, Browne E, Greenwood B, Chandramohan D, 2007. Comparison of the therapeutic efficacy of chloroquine and sulphadoxine-pyrimethamine in children and pregnant women. *Trop Med Int Health*, 12: 1288–97.

Tahar R, Djaman J, Ferreira C, Basco L, 2007. Surveillance de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine par le test moléculaire à São Tomé et Príncipe. *Bull Soc Pathol Exot*, 100: 115-118.

Targett G, Drakeley C, Jawara M, Von Seidlein L, Coleman R, Deen J, Pinder M, Doherty T, Sutherland C, Walraven G, Milligan P, 2001. Artesunate reduces but does not prevent posttreatment transmission of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles gambiae*. *J Infect Dis*, 183: 1254-1259.

Tatem AJ, Smith DL, 2010. International population movements and regional *Plasmodium falciparum* malaria elimination strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107: 12222-12227.

Tekete M, Djimde AA, Beavogui AH, Maiga H, Sagara I, Fofana B, Ouologuem D, Dama S, Kone A, Dembele D, Wele M, Dicko A, O gobara K, 2009. Efficacy of chloroquine, amodiaquine and sulphadoxine-pyrimethamine for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria: revisiting molecular markers in an area of emerging AQ and SP resistance in Mali. *Malar J*, 8: 34.

Ter Kuile FO , Rogerson SJ, 2008. *Plasmodium vivax* Infection during Pregnancy: An Important Problem in Need of New Solutions. *Clin Infect Dis*, 46: 1382-4.

Ter Kuile FO, Steketee RW, 2007a. Intermittent preventive therapy with sulfadoxine-pyrimethamine during pregnancy: seeking information on optimal dosing frequency. *J Infect Dis*, 196: 1574-1576.

Ter Kuile FO, van Eijk AM, Filler SJ, 2007b. Effect of sulfadoxine-pyrimethamine resistance on the efficacy of intermittent preventive therapy for malaria control during pregnancy: a systematic review. *JAMA*, 297: 2603-16.

Thera MA, Sehdev PS, Coulibaly D, Traore K, Garba MN, Cissoko Y, Kone A, Guindo A, Dicko A, Beavogui AH, Djimde AA, Lyke KE, Diallo DA, Doumbo OK, Plowe CV, 2005. Impact of trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis on *falciparum* malaria infection and disease. *J Infect Dis*, 192: 1823-9.

Tinto H, Rwagacondo C, Karema C, Mupfasoni D, Vandoren W, Rusanganwa E, Erhart A, Van Overmeir C, Van Marck E, D'Alessandro U, 2006. In-vitro susceptibility of *Plasmodium falciparum* to monodesethylamodiaquine, dihydroartemisinin and quinine in an area of high chloroquine resistance in Rwanda. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 100, 509-14.

Tinto H, Guekoun L, Zongo I, Guiguemde RT, D'Alessandro U, Ouedraogo JB, 2008. Chloroquine-resistance molecular markers (*Pfprt* T76 and *Pfmdr-1* Y86) and amodiaquine resistance in Burkina Faso. *Trop Med Int Health*, 13: 238-240.

Tipke M, Diallo S, Coulibaly B, Störzinger D, Hoppe-Tichy T, Sie A, Müller O, 2008. Substandard anti-malarial drugs in Burkina Faso. *Malar J*, 7: 95.

Tiono B, Ouedraogo A, Bougouma C, Diarra A, Konaté T, Nébié I, Sirima B, 2009. Placental malaria and low birth weight in pregnant women living in a rural area of Burkina Faso following the use of three preventive treatment regimens. *Malar J*, 8: 224.

Touré AO, Koné LP, Jambou R, Konan TD, Demba S, Beugre GE, Koné M, 2008. Sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* à la quinine, l'artésunate et la chloroquine à Abidjan (Côte d'Ivoire). *Cahiers Santé*, 18:43-47.

Torpin R, 1941. Malaria complicating pregnancy. *Am J Obs Gynaecol*, 41: 882-885.

Trape JF, 2001. The public health impact of chloroquine resistance in Africa. *Am J Trop Med Hyg*, 64: 12-17.

Triglia T, Cowman AF, 1999. Priary structure and expression of the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 7149-7153.

Valderramos SG, Scafield D, Uhlemann AC, Fidock DA, Krishna S, 2010. Investigations into the role of the *Plasmodium falciparum* SERCA (PfATP6) L263E mutation in artemisinin action and resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 54: 3842-52.

Vallely A, Vallely L, Chagalucha J, Greenwood B, Chandramohan D, 2007. Intermittent preventive treatment for malaria in pregnancy in Africa: what's new, what's needed? *Malar J*, 6: 16.

Vanga-Bosson HA, Coffie PA, Kanhon S, Sloan C, Kouakou F, Eholie SP, Kone M, Dabis F, Menan H, Ekouevi DK, 2011. Coverage of intermittent prevention treatment with sulphadoxine-pyrimethamine among pregnant women and congenital malaria in Côte d'Ivoire. *Malar J*, 10: 105.

Vanga-Bosson HA, Djohan V, Yavo W, Kiki-Barro PMC, Menan HE, Koné M, 2010. Etude Comparative de la Chloroquine Versus Sulfadoxine-Pyrimethamine Dans la Prévention du Paludisme Chez les Femmes Enceintes à Abobo-sud (Abidjan – Côte d'Ivoire). *Eur J Sci Res* 42: 177-183.

Verdrager J, 1986. Epidemiology of emergence and spread of drug-resistant *falciparum* malaria in Southeast Asia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 17: 111-118.

Vieira PP, das Gracias Alecrim M, da Silva LH, Gonzalez-Jimenez I, Zalis MG, 2001. Analysis of the PfCRT K76T mutation in *Plasmodium falciparum* isolates from the Amazon region of Brazil. *J Infect Dis*, 183: 1832-1833.

Vinayak S, Alam MT, Mixson-Hayden T, McCollum AM, Sem R, Shah NK, Lim P, Muth S, Rogers WO, Fandeur T, Barnwell JW, Escalante AA, Wongsrichanalai C, Arieu F, Meshnick SR, Udhayakumar V, 2010. Origin and evolution of sulfadoxine resistant *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathog*, 6: e1000830.

Walliker D, 2005. The hitchhiker's guide to malaria parasite genes. *Trends Parasitol*, 21: 489-493.

Walliker D, Hunt P, Babiker H, 2005. Fitness of drug-resistant malaria parasites. *Acta Trop*, 94: 251-259.

Walther B, Miles DJC, Crozier S, Waight P, Palmero MS, Ojuola O, Touray E, van der Sande M, Whittle H, Rowland-Jones S, Flanagan KL, 2010. Placental Malaria is associated with reduced early life weight development of affected children independent of low birth weight. *Malar J*, 9: 16.

Wang X, Mu J, Li G, Chen P, Guo X, Fu L, Chen L, Su X, Wellems TE, 2005. Decreased prevalence of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter 76T marker associated with cessation of chloroquine use against *P. falciparum* malaria in Hainan, People's Republic of China. *Am J Trop Med Hyg*, 72: 410-414.

Watkins WM, Mosobo M, 1993. Treatment of *Plasmodium falciparum* malaria with pyrimethamine-sulfadoxine: selective pressure for resistance is a function of long elimination half-life. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 87: 75-78.

Wellems TE, Plowe CV, 2001. Chloroquine-resistant malaria. *J Infect Dis*, 184: 770-776.

White NJ, 2010. Artemisinin resistance - the clock is ticking. *Lancet*, 376: 2051.

White NJ, 2008. Qinghaosu 1. (artemisinin): the price of success. *Science*, 320: 330-4.

White NJ, 2004. Antimalarial drug resistance. *J Clin Invest*, 113: 1084-1092.

White NJ, 2005. Intermittent presumptive treatment for malaria. *PLoS Med* 2: e3.

White NJ, Pongtavornpinyo W, Maude RJ, Saralamba S, Aguas R, Stepniewska K, Lee SJ, Dondorp AM, White LJ, Day NPJ, 2009. Hyperparasitaemia and low dosing are an important source of anti-malarial drug resistance. *Malar J*, 8: 253.

Wickramasuriya G, 1935. Some observations on malaria occurring in association with pregnancy. *J Obs Gynaecol Br Empire*, 816-833.

Wilson NO, Ceesay FK, Obed SA, Adjei AA, Gyasi RK, Rodney P, Ndjakani Y, Anderson WA, Lucchi NW, Stiles JK, 2011. Intermittent Preventive Treatment with Sulfadoxine-Pyrimethamine against Malaria and Anemia in Pregnant Women. *Am J Trop Med Hyg*, 85: 12–21.

Wootton JC, Feng X, Ferdig MT, Cooper RA, Mu J, Baruch DI, Magill AJ, Su XZ, 2002. Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 418: 320-323.

World Health Organization (WHO). WHOMalaria report 2011. http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/9789241564403_eng.pdf.

Consulté le 15 mai 2012

World Health Organization (WHO). *Global Plan for Artemisinin Resistance Containment (GPARC)*; WHO: Geneva, Switzerland, 2011; http://www.who.int/malaria/publications/atoz/artemisinin_resistance_containment_2011.pdf (consulté le 29 Mai 2011).

World Health Organization (WHO), 2010. Guidelines for the treatment of malaria-2nd edition

World Health Organization (WHO). *Global Report on Antimalarial Efficacy and Drug Resistance: 2000-2010*; WHO: Geneva, Switzerland, 2010 http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/97892415-00470_eng.pdf (consulté le 14 Mai 2011)

World Health Organization (WHO), 2009. World malaria report 2009. http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241563901_eng.pdf. (consulté le 21 sept 2010)

World Health Organization (WHO), 2007. Assessment of the safety of artemisinin compounds in pregnancy 2007. <http://apps.who.int/tdr/svc/publications/tdr-research-publications/artemisinin-compounds-pregnancy> (consulté le 20 septembre 2010)

World Health Organization (WHO), 2006. A strategic framework for malaria prevention and control during pregnancy in the Africa region. AFR/ MAL/04/01. Brazzaville, Republic of the Congo: WHO Regional Office for Africa, 2006.

World Health Organization (WHO), 2005. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs : report on global monitoring : 1996-2004. WHO/HTM/MAL/2005.1103, 133p.

WHO and UNICEF, (2005). World Malaria Report. World Health Organisation, WHO/HTM/MAL/2005.1102.

World Health Organization (WHO), 2003. Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated falciparum malaria Volume 50. Geneva: 1-68. WHO/HTM/ RBM.

Wu Y, Kirkman LA, Wellems TE, 1996. Transformation of *Plasmodium falciparum* malaria parasites by homologous integration of plasmids that confer resistance to pyrimethamine. Proc Natl Acad Sci USA, 93: 1130-1134.

Yavo W, Bla KB, Djaman AJ, Assi SB, Basco LK, Mazabraud A, Koné M, 2010. In vitro susceptibility of *Plasmodium falciparum* to monodesethylamodiaquine, quinine, mefloquine and halofantrine in Abidjan (Côte d'Ivoire). *Afr Health Sci*.10:111–116.

Yeka, A., G. Dorsey, M. R. Kanya, A. Talisuna, M. Lugesha, J. B. Rwakimari, S. G. Staedke, P. J. Rosenthal, F. Wabwire-Mangen, and Bukirwa H, 2008. Artemether-lumefantrine versus dihydroartemisinin-piperaquine for treating uncomplicated malaria: a randomized trial to guide policy in Uganda. *PLoS One*, 3: e2390.

ANNEXES ET PUBLICATIONS

ANNEXE 1

Plate ID:											Date:	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figure : Plan de plaque ('Plate ID' : Etiquette de la plaque).

ANNEXE 2 : Classification de la réponse thérapeutique

• Echec thérapeutique précoce (ETP)

- Apparition de signes de danger ou d'un paludisme grave aux jours 1, 2 ou 3, en présence d'une parasitémie
- Parasitémie au jour 2 supérieure à celle du jour 0, quelle que soit la température axillaire
- Parasitémie au jour 3 avec température axillaire $\geq 37,5$ °C
- Parasitémie au jour 3 $\geq 25\%$ à celle du jour 0

• Echec clinique tardif (ECT)

- Apparition de signes de danger ou d'un paludisme grave après le jour 3 en présence d'une parasitémie, sans qu'aucun critère d'Echec thérapeutique précoce n'ait été satisfait auparavant
- Présence d'une parasitémie et d'une température axillaire $\geq 37,5$ °C entre le jour 4 et le jour 28, sans qu'aucun critère d'Echec thérapeutique précoce n'ait été satisfait auparavant

• Echec parasitologique tardif (EPT)

- Présence d'une parasitémie au jour 28 et température axillaire $< 37,5$ °C, sans qu'aucun critère d'Echec thérapeutique précoce ou d'Echec clinique tardif n'ait été satisfait auparavant

• Réponse clinique et parasitologique adéquate (RCPA)

- Absence de parasitémie au jour 28 quelle que soit la température axillaire, sans qu'aucun critère d'Echec thérapeutique précoce, d'Echec clinique tardif ou d'Echec parasitologique tardif n'ait été satisfait auparavant

Comparative efficacy of uncontrolled and controlled intermittent preventive treatment during pregnancy (IPTp) with combined use of LLTNs in high resistance area to sulfadoxine-pyrimethamine in Côte d'Ivoire

This article was published in the following Dove Press journal:
Infection and Drug Resistance
10 March 2012
[Number of times this article has been viewed](#)

A Toure Offianan¹
Louis K Penali¹
MA Coulibaly¹
NL Tiacoh¹
AAB Ako¹
EG Adji¹
B Coulibaly¹
D Koffi¹
D Sarr²
R Jambou³
M Kone⁴

¹Department of Malariology, Institut Pasteur of Côte d'Ivoire, ²Department of Infectious Diseases, University of Georgia, Athens, GA, ³Department of Immunology, Institut Pasteur of Madagascar, Tananarive, Madagascar, ⁴UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, University of Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire

Introduction: In recent years, intermittent preventive treatment for pregnancy (IPTp) with sulfadoxine-pyrimethamine (SP) has become policy in much of sub-Saharan Africa. But resistance to SP has been spreading across sub-Saharan Africa and thus the effectiveness of IPTp-SP has been questioned. The present study therefore sought to assess the incidence of placental malaria, low birth weight, and anemia of two IPTp-SP approaches (directly observed treatment scheme versus no directly observed treatment) in Anonkoua-Kouté and Samo, Côte d'Ivoire where the reported prevalence of *dfr* single mutant 108 was 62% and 52.2%, respectively.

Methods: The study was a longitudinal design involving pregnant women and was conducted in Anonkoua-Kouté, a suburban area, and Samo, a rural area, from January 2008 through March 2009. Women of a pregnancy less than 28 weeks duration were randomized to receive SP (1.5 g/0.075 g SP) in a single intake twice and were followed up monthly until delivery. Doses were administered under supervision in the controlled IPTp group, while SP was given free to women in the uncontrolled IPTp group with a recommendation to take it at home. The primary end point was the proportion of low birth weight infants (body weight < 2500 g) and the secondary end point was the rate of severe anemia and placental malaria detected at delivery.

Results: A total of 420 pregnant women were enrolled (212 and 208, respectively, in the controlled and uncontrolled groups). Delivery outcome was available for 378 women. In the modified intention-to-treat analysis, low birth weight infants were born from 15.5% of women of the uncontrolled IPTp group and from 11.9% of women in the controlled IPTp group ($P = 0.31$). The per-protocol population analysis showed consistent results. The proportion of women with placental malaria infection, moderate anemia (hemoglobin < 11 g/dL), and severe anemia (hemoglobin < 8 g/dL) at delivery were similar between the two groups ($P > 0.05$).

Conclusion: The study showed that the two approaches were equivalent, suggesting that unsupervised IPTp-SP free of charge should be used in areas where implementation of the directly observed treatment scheme suffers from many constraints.

Keywords: IPTp, SP efficacy, DOT scheme, resistance, Côte d'Ivoire

Introduction

In sub-Saharan Africa, approximately 25 million pregnant women are at risk of *Plasmodium falciparum* infection every year. In recent years, intermittent preventive treatment for pregnancy (IPTp) with sulfadoxine-pyrimethamine (SP) has become

Correspondence: A Toure Offianan
Department of Malariology, Institut Pasteur of Côte d'Ivoire, PO Box 490, Abidjan 01, Côte d'Ivoire
Email andre_offianan@yahoo.fr

policy in much of sub-Saharan Africa.¹ IPTp consists of administration of a curative dose of an efficacious anti-malarial drug at least twice during the second and third trimesters of pregnancy during routinely scheduled antenatal clinic visits irrespective of the presence of signs for a malaria infection.² Currently, IPTp-SP has been rated as having the most favorable cost–benefit profile because of its relatively low cost, high compliance, and efficacy in reducing maternal anemia and low birth weight (LBW).^{3,4} However, implementation of IPTp in most settings is limited by social, cultural, economic and operational challenges despite good coverage of antenatal services.^{5,6} In addition, a controversy has raised questions as to whether this was the most appropriate approach for malaria prevention in African pregnant women given the reported increase in parasite resistance to SP in some areas.^{4,7–9} Recent studies have shown high prevalence of *dhfr* and *dhps* resistant mutant parasites in the authors' study sites (unpublished data).^{10,11} The current national treatment guidelines and policy for malaria in Côte d'Ivoire adopted the World Health Organization's recommendation for malaria prevention and control during pregnancy. This means the implementation of an intervention package into the antenatal care (ANC) services including the use of insecticide-treated nets (ITNs) and IPTp as well as effective case management of malaria infection in pregnant women and anemia.¹ Thus, since 2005, the National Malaria Control Program recommends SP as the first-line agent for IPTp and quinine for treatment of clinical malaria in all trimesters. Since this adoption, few studies have investigated the efficacy of IPTp-SP.⁸ Compliance with the recommendation that the IPTp drug should be given under supervision in the clinic was very low.^{12,13} Studies related to IPTp use during pregnancy in Côte d'Ivoire are limited and few were found to have looked into compliance especially with the directly observed treatment (DOT) scheme. In a study conducted in 2006 in four maternities, placental parasitemia was identified in 29.26% of delivering women who received two or more doses of SP.¹⁴ This ineffectiveness of IPTp could be related to the inefficacy of SP as the IPTp drug or participants did not take SP as the intake was not supervised in most participants. These findings were confirmed by Vanga-Bosson et al.¹⁵ The low use of IPTp-DOT scheme and poor adherence in previous studies may be a proxy to the practice of IPTp in the whole country.

The objective of this study was to assess the incidence of placental malaria, LBW, and maternal anemia of two IPTp-SP approaches (controlled or DOT scheme versus uncontrolled IPTp-SP or no DOT). Results obtained from this study will

allow for implementation of effective and knowledge-based intervention against this major cause of maternal and child morbidity and mortality in sub-Saharan Africa.

Methods

Study sites

The trial was conducted from January 2008 through March 2009 in Anonkoua-Kouté and Samo. Anonkoua-Kouté is a suburban area of Abidjan while Samo is a village near Bonoua and located 50 km north of Abidjan. In the study sites, perennial malaria transmission with seasonal peaks is mostly attributable to *P. falciparum*.

Ethical clearance

The study was approved by the National Ethics Committee of Life and Health Sciences of Côte d'Ivoire. All study participants were informed in their local language about the study objectives and procedures. For each study participant, written informed consent was obtained and the participant was free to withdraw consent at any time of the study without influencing their access to health services.

Enrollment

An identification number was given to each potentially eligible woman who attended the antenatal clinic and a first questionnaire was completed to assess eligibility.

Eligibility criteria were: at least 15 years old, living in the study area or the surrounding regions for at least 6 months, availability for follow-up during the pregnancy and willingness to deliver at the study site, a pregnancy of less than 28 weeks duration, willingness to come back for a planned visit and be visited by a field worker during pregnancy, and willingness to comply with study procedures.

Women who reported living 10 km from the site, who were severely ill (had medical conditions requiring hospital admission), or who reported prior adverse drug reaction to sulfa-containing medications or any other antimalarial medication were excluded.

For each study participant, a Case Report Form at inclusion was completed, which provided information on age, district of residence, sociodemographic characteristics, education, previous and current obstetric history, previous illness, treatment during the current pregnancy, and measures for malaria prevention. Gestational age was estimated using the date of the last menstrual period and/or by measurement of uterine fundal height. Obstetrical ultrasound was also used to determine the gestational age. Venous blood samples were collected for determination of the hemoglobin (Hb) level,

and thick and thin blood smears were performed to detect malaria. Human immunodeficiency virus (HIV) screening was routinely undertaken in the study area after informed consent. Women who were known to be HIV infected before enrollment were also recruited.

Randomization and treatment

Study participants were randomly assigned to one of the two treatment groups using a computer generated random list. The study pharmacist, who did not take part in any other activities in the study, prepared an individual randomization code envelope from the randomization list. The sealed envelopes were sequentially numbered. When an eligible woman joined the study, the envelope with the lowest available number was opened, revealing the assignment of the participant to the appropriate treatment group.

In the controlled IPTp group, all women received DOT while in the uncontrolled IPTp group the treatment administration was not supervised (no DOT). Each woman in the no DOT group was given medication for self administration at home. Efforts were made in this group to sensitize each participant regarding the importance in taking the drugs to avoid the consequences of malaria for herself and her baby. The empty sachets were verified by a field worker as evidence of taking the drug 72 hours after.

In the two groups, the IPTp regimen consisted of a single curative dose of 1.5 g/0.075 g SP at each of the ANC visits (ANC1 and ANC2). Doses were given twice from the second trimester, at least 1 month apart. Regardless of their gestational age, all women at recruitment received a long lasting ITN (LLITN).

Follow-up

Enrolled pregnant women were followed up to delivery. At enrollment and subsequent visits, the study midwife collected the study data using a standardized questionnaire.

A physical examination was performed to measure axillary temperature, blood pressure, weight, and uterine height.

ANC visits

At each ANC visit, information on previous illnesses and treatments were collected and fundal height and axillary temperature were measured. The number of tablets of SP-DOT and other medicines handed to mothers were recorded. A blood sample was obtained by fingerprick for thick and thin blood films. Similar information was collected at unscheduled visits.

Delivery

During labor, venous blood samples were collected for determination of Hb concentration and malaria diagnosis. Immediately after delivery, babies were weighed using a hanging weighing scale (Model 180; Salter Brecknell, West Midlands, United Kingdom). Data regarding newborn characteristics (vital status at birth, birth weight, sex, and the presence of twins or malformation) were collected. Blood smears were made with blood collected from the maternal side of the delivered placenta and the umbilical vein cord. In addition, pieces of placental tissues were used to prepare impression smears after swabbing it on blotting paper. If women delivered outside and attended the study site immediately, Hb level, sex, Apgar index, and birth weight were assessed.

Sample size calculation

An absolute difference of 15% in the prevalence of placental malaria between the uncontrolled and controlled groups was considered to be of interest. It has been reported that about 29% of placental malaria occurs in the study sites;¹⁴ and the sample size calculation for a 5% type I error and a 10% type II error yielded 169 subjects in each group. For practical reasons, it was finally decided to include 400 participants (200 in each group).

Laboratory procedures

All participants received routine prenatal tests which included blood group and antibody screening, rubella, toxoplasma, syphilis, and midstream urine test, Hb electrophoresis, blood urea nitrogen, glycemia, and creatinemia screening, and obstetrical ultrasound.

Thick films and placental impression smears were stained with 10% Giemsa for 15 minutes. To determine the percentage of malaria parasitemia from placental impression smears, malaria parasite-infected red cells were counted against 2000 erythrocytes.

Placental infection status was categorized as infected (presence of any asexual parasite stages in the placenta) and noninfected (parasite negative smear). Smears with malaria pigment but with no asexual parasite stages were declared as unknown and were not included in the analysis. Microscopic examination of blood smears was done under oil immersion for parasite detection and 200 high-power fields were examined before the smear was considered negative. Parasites were enumerated using thick film, as previously described.¹⁶ The parasite density (per 1 μ L of blood) was calculated, assuming a normal leukocyte level of 8000/1 μ L.

The thin film was used to speciate the parasites. Each blood film was independently examined by two microscopists. In cases of discrepancy, a third microscopist counted the number of parasites in the films. The average of two counts that agreed was used as the final level of parasitemia.

Venous blood (5 mL) was collected using butterfly needles into ethylenediaminetetraacetic acid Vacutainer® tubes (BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ) for measurement of Hb levels using an automated hematology analyzer (Mythic 22; Orphee SA, Geneva, Switzerland).

Management of anemia and malaria cases

Study participants found to be anemic at ANC visits (Hb level <11 g/dL) were treated, based on national guidelines, with ferrous sulfate (200 mg) and folic acid (0.25 mg) given as a single combined tablet daily for 30 days. Confirmed cases of malaria (axillary temperature $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$ and with a positive smear test) were given treatment with quinine, based on the national malaria treatment guidelines for pregnant women.

Definitions

LBW was defined as a birth weight less than 2500 g, prematurity as a gestational age of less than 37 weeks (determined by Ballard examination), and maternal anemia as moderate to severe for Hb <11 g/dL and Hb <8 g/dL, respectively.

Statistical analysis

The primary efficacy endpoint was the proportion of LBW infants. The secondary end points were the proportions of women with placental malaria (ie, presence of asexual-stage parasites in the placental impression smear), moderate maternal anemia (Hb <11 g/dL), and severe maternal anemia (Hb <8 g/dL) at delivery as well as the mean birth weight and mean maternal Hb level at delivery. For the primary end point, the analysis was performed on the modified intention-to-treat (ITT) population of women who completed the study (and for the women whose infants' information on birth weight was collected). The analysis was also conducted for the per-protocol (PP) population, excluding women who were lost to follow-up. For secondary endpoints, the analyses were performed in the PP population and they included data on stillbirths and spontaneous abortion. Differences in frequencies were compared by either chi-squared or Fisher's exact tests as appropriate, and continuous variables by Student's *t*-test when the data were normally distributed. Nonparametric tests were used for nonnormally distributed data. In the multivariable analysis, the factors associated with the dependant variable (LBW or placental malaria or anemia) based on

univariable analysis were included. Statistical analyses were performed using Stata® version 10.0 (StataCorp LP, College Station, TX).

Results

Characteristics of the study participants at enrollment

Study population

A total of 628 pregnant women were screened. Overall, 420 women were randomized to receive IPTp-SP (212 in controlled IPTp group and 208 in uncontrolled IPTp group). The reasons for ineligibility were unwillingness to consent to the study (no permission from husband), gestational age more than 28 weeks, low probability of completing follow-up (planning to travel before delivery), and allergies to sulfonamides.

Endpoint was reached in 366 and 339 women for modified ITT and PP analysis, respectively, for both treatment groups. The trial profile is shown in Figure 1.

Characteristics of the mothers are summarized in Table 1. The mean age of the participants was 25.86 and 26.13 years in the uncontrolled and controlled groups, respectively. Primigravidae and secundigravidae represent 50.2% of the total sample size. There was more secundigravidae in the uncontrolled group than the controlled group (31.3% versus 21.7%; $P = 0.02$).

Follow-up

The second dose was not administered to 12% of women in the controlled group and 11% of women in the uncontrolled group. The main reasons for failure to administer the second dose (controlled versus uncontrolled) included travel (5% versus 2%), refusal because of the occurrence of an adverse event after the first dose (2% versus 3%), and delivery before administration of the second dose (1% versus 2%) (Figure 1). Overall, 25 (6%) of 420 women (nine in controlled group and 16 in uncontrolled group) delivered outside the study maternity clinics. For those women, birth weights were recorded from ANC cards. A total of 366 birth weights were collected (including weights for stillborn babies). The mean birth weight was 2898.13 ± 37.39 g and 2967 ± 33.52 g in the uncontrolled and controlled groups, respectively, regarding the modified ITT population. There was no significant difference between the two groups for the mean birth weight or the rate of LBW ($P = 0.31$). In the PP population, the mean weight was 2894 ± 38.15 g (uncontrolled group) and 2966.70 ± 35.47 g (controlled group) ($P = 0.16$). In the modified ITT analysis, LBW infants were born to 15% of women in the uncontrolled IPTp group and to 12% of women in

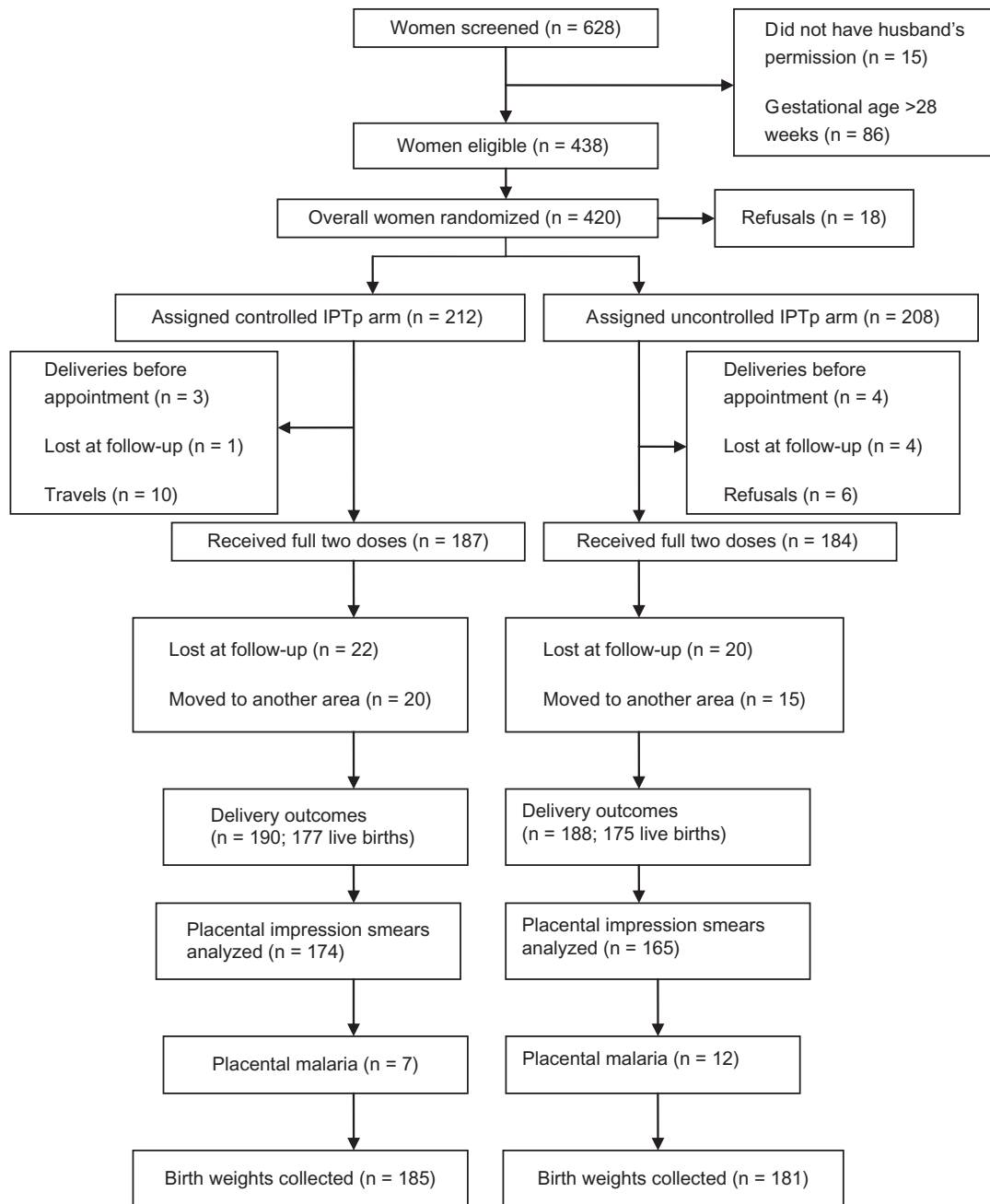


Figure 1 Trial profile.

Abbreviation: IPTp, intermittent preventive treatment during pregnancy.

the controlled IPTp group ($P = 0.31$). The PP analysis showed consistent results (Table 2). The factors associated with LBW in the multivariable analysis were placental malaria (adjusted odds ratio = 6.9, 95% confidence interval 2.6–18), maternal malaria at delivery (odds ratio = 0.6, 95% confidence interval

0.08–3.9), and moderate anemia (odds ratio = 1.7, 95% confidence interval 0.8–3.5) (Table 3).

By stratifying according to gravidity, there was no significant difference between groups in terms of LBW either in primigravidae, secundigravidae, or in multigravidae, but

Table I Sociodemographic characteristics at inclusion

	Uncontrolled IPTp group (N = 208)			Controlled IPTp group (N = 212)			P value
	n	%	95% CI	n	%	95% CI	
Age							
15–19 years	29	13.9	0.09–0.19	25	11.8	0.76–0.16	0.49
20–29 years	126	60.6	0.54–0.68	119	56.1	0.49–0.63	0.32
30–39 years	50	24	0.18–0.30	66	31.1	0.25–0.37	0.11
40–50 years	3	0.5	–0.003–0.023	2	1	–0.003–0.023	0.68
Gravidity							
Primigravid	43	20.7	0.15–0.27	57	26.9	0.21–0.33	0.13
Secundigravid	65	31.3	0.25–0.37	46	21.7	0.16–0.28	0.02
Multigravid	100	48	0.41–0.55	109	51.4	0.44–0.55	0.49
Gestational age							
9–15 weeks	44	21.2	0.15–0.27	28	13.2	0.08–0.18	0.032
16–20 weeks	97	46.6	0.40–0.54	108	50.9	0.44–0.58	0.35
21–25 weeks	48	23.1	0.17–0.29	60	28.3	0.22–0.34	0.21
26–30 weeks	19	9.1	0.51–0.29	16	7.5	0.04–0.12	0.56
Education							
None	129	62	0.55–0.69	88	41.5	0.34–0.48	<0.0001
Primary school	57	27.4	0.21–0.33	56	26.4	0.20–0.32	0.82
Secondary school	15	7.2	0.04–0.10	41	19.3	0.14–0.24	0.0002
University	7	3.4	0.00–0.05	27	12.7	0.08–0.18	0.0004
Profession							
Homemaker	128	61.5	0.54–0.68	108	50.9	0.44–0.58	0.028
Shopkeeper	55	26.4	0.20–0.32	56	26.4	0.20–0.32	1
Student	4	1.9	0.00–0.04	10	54.7	0.02–0.08	0.18
Couturier	6	2.9	0.01–0.05	17	8	0.04–0.12	0.02
Teacher	4	1.9	0.00–0.04	1	0.5	–0.00–0.01	0.021
Student (university)	5	2.4	0.00–0.04	12	5.7	0.03–0.09	0.09
Hairdresser	1	0.5	–0.00–0.01	4	1.9	0.00–0.04	0.37
Others	5	2.4	0.00–0.04	4	1.9	0.00–0.04	0.74
Sickle cell status							
Positive	2	1	–0.00–0.02	3	1.4	–0.00–0.02	1
Negative	61	29.3	0.23–0.35	86	40.6	0.34–0.48	0.015
Unknown	145	69.7	0.64–0.76	123	58	0.51–0.65	0.012
HIV status							
Positive	5	2.4	0.00–0.04	7	3.3	0.00–0.05	0.57
Negative	125	60.1	0.53–0.67	115	54.2	0.47–0.61	0.22
Unknown	78	37.5	0.31–0.45	90	42.5	0.36–0.50	0.30

Notes: Data are number (%) of women with the characteristic, unless otherwise indicated. P values were determined by chi-squared or Fisher's exact test as appropriate. P < 0.05 was considered statistically significant.

Abbreviations: CI, confidence interval; HIV, human immunodeficiency virus; IPTp, intermittent preventive treatment during pregnancy.

sample sizes had a low power to detect a difference between groups (Table 2).

All women who were parasitemic at enrollment received antimalarial treatment using quinine. All patients recovered completely and were microscopically confirmed negative. The rate of malaria at inclusion was 9.6% and 8.5% in the uncontrolled and controlled group, respectively. During the follow-up period, 18 (8.7%) and eleven (5.2%) clinical episodes of *P. falciparum* malaria were observed in the uncontrolled and controlled groups, respectively (Table 4). Most of the clinical episodes occurred in the second trimester. The proportion of women with peripheral malaria at delivery was 4.9% in the uncontrolled group and

4% in the controlled group (PP analysis). There were no significant differences in the prevalence of placental infection (impression smear positive) between the two groups (7.3% versus 4%; P = 0.19) (Table 5). Women with clinical malaria during pregnancy had a high risk (odds ratio = 7.9) of placental malaria.

At inclusion, 65 (31.3%) and 56 (26.4%) participants had moderate anemia (Hb <11 g/dL) in the uncontrolled and controlled groups, respectively. The mean Hb concentration at delivery was 9.87 ± 0.1419 g/dL in the uncontrolled group and 10.22 ± 0.1301 g/dL in the controlled group. In the uncontrolled and controlled groups, the rate of moderate anemia (Hb <11 g/dL) was 50.9% and 46%, respectively,

Table 2 Proportion of women with low birth weight infants (<2500 g)

Women assessed	Uncontrolled IPTp group			Controlled IPTp group			P value
	n/N	%	95% CI	n/N	%	95% CI	
All							
ITT	55/208	26.4	0.20–0.32	49/212	23.1	0.17–0.29	0.43
Modified ITT	28/181	15.5	0.10–0.20	22/185	11.9	0.07–0.17	0.31
PP	26/165	15.8	0.10–0.22	20/174	11.5	0.06–0.16	0.25
Primigravid							
ITT	14/59	23.7	0.13–0.35	14/68	20.6	0.11–0.31	0.67
Modified ITT	9/54	16.7	0.07–0.27	6/54	11.1	0.03–0.19	0.38
PP	9/51	17.7	0.07–0.29	6/57	10.5	0.02–0.18	0.29
Secundigravid							
ITT	20/65	30.8	0.20–0.42	10/42	23.8	0.11–0.37	0.43
Modified ITT	9/54	16.7	0.07–0.27	4/36	11.1	0.01–0.21	0.55
PP	8/51	15.7	0.06–0.27	3/33	9.1	–0.00–0.20	0.51
Multigravid							
ITT	21/84	25	0.16–0.34	25/102	24.5	0.16–0.32	0.92
Modified ITT	10/72	13.9	0.06–0.22	12/89	13.5	0.06–0.20	0.92
PP	9/63	14.3	0.05–0.23	11/84	13.1	0.06–0.20	0.84

Notes: Data represent number of births for which low birth weight was detected/number of singleton births analyzed (% of births for which low birth weight was detected). P values were determined by chi-squared or Fisher's exact test as appropriate. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Abbreviations: CI, confidence interval; IPTp, intermittent preventive treatment during pregnancy; ITT, intention-to-treat analysis; PP, per-protocol analysis.

while the proportion of severe anemia (Hb <8 g/dL) was 14.6% and 9.8%, respectively (Table 5).

Pregnancy outcome

Information on pregnancy outcome and on the survival of babies born from women enrolled in this study is summarized in Table 6. Delivery was observed in 188 and 190 women, respectively, in the uncontrolled and controlled groups (Figure 1).

Adverse events: mothers

Moderate adverse events occurred in 24% and 22% of the participants, respectively, in the controlled and uncontrolled groups. The most common complaints were nausea,

vomiting, tiredness, and headaches; and no significant difference between the two groups was observed ($P > 0.05$) (Figure 2).

Discussion

Currently, the World Health Organization recommends, for prevention of malaria during pregnancy, a package of interventions for pregnant women living in areas where malaria is endemic, including IPT, ITNs, case management of clinical malaria, and diagnosis and treatment of anemia.¹ Clinical trials have demonstrated the positive impact of IPTp-SP or other effective antimalarials, such as mefloquine, on placental parasitemia, anemia, and LBW.^{17,18} In recent years, IPTp-SP has been the cornerstone of malaria control in pregnant women living in stable transmission areas.

The comparison of efficacy (mainly on birth weight) between pregnant women receiving IPTp-SP, either under supervision or without any control, in Côte d'Ivoire was assessed in this study. Birth weight was used as the primary end point, because it is a good public health indicator of the consequences of malaria in pregnancy, and it correlated with the efficacy of IPTp in several studies.^{18,19}

Maternal anemia has been proposed as an indicator for monitoring malaria control in sub-Saharan Africa,²⁰ based on the excess of risk of anemia in primigravidae compared to multigravidae.

The prevalence of malaria infection during pregnancy was lower in the controlled group than in the uncontrolled

Table 3 Factors associated with low birth weight or placental malaria: logistic regression model

	Odds ratio	95% CI	P value
Low birth weight			
Placental malaria	8.5	1.8–40.2	0.007
Malaria infection (at delivery)	0.6	0.1–4	0.59
Moderate anemia (Hb <11 g/dL)	1.7	0.8–3.5	0.14
Severe anemia (Hb <8 g/dL)	1	0.3–3.4	1
Placental malaria			
Primigravid	5.3	0.5–60	0.18
Secundigravid	1.9	0.2–20.7	0.61
Malaria during pregnancy	6.8	1–44.4	0.04
Moderate anemia	4.2	0.5–38.8	0.20

Note: Adjusted odds ratio of placental malaria and malaria during pregnancy was 6.9 and 7.4, respectively.

Abbreviations: CI, confidence interval; Hb, hemoglobin.

Table 4 Rates of parasitemia, reported fever, and anemia among participants

	Uncontrolled IPTp group				Controlled IPTp group				P value
	n/N (%)	Mean	Median	95% CI	n/N (%)	Mean	Median	95% CI	
Fever (T ≥37.5°C)									
At inclusion	40/208 (19.2)	37.7	37.5	13.7–24.3	14/212 (6.6)	37.7	37.7	2.8–9.2	0.0001
During pregnancy	25/208 (12)	38.0	37.9	7.6–16.4	17/212 (8)	38.1	37.9	4.3–11.7	0.17
At delivery	24/192 (12.5)	37.8	37.7	8.2–17.8	18/188 (9.6)	37.6	37.5	5.7–14.3	0.36
Parasitemia									
At inclusion	20/208 (9.6)	150.1	0	5.9–14.1	18/212 (8.5)	47	0	4.3–1.7	0.68
During pregnancy	18/208 (8.7)	456	0	5.1–12.9	11/212 (5.2)	317.7	0	2.1–7.9	0.16
At delivery	10/186 (5.3)	1345.6	0	02.0–8.5	7/186 (3.7)	332.3	0	0.9–6.4	0.45
Anemia at inclusion									
(Hb <11 g/dL)	65/208 (31.3)	9.8	10	24.7–37.3	56/212 (26.4)	10.2	10.5	20.1–31.9	0.27

Notes: P values were determined by chi-squared or Fisher's exact test as appropriate. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Abbreviations: CI, confidence interval; Hb, hemoglobin; IPTp, intermittent preventive treatment during pregnancy; T, temperature.

group with no statistical difference. The results showed that the presence of malaria parasites in the peripheral blood of clinically symptomatic pregnant women is an indication of ongoing placental infection, as previously shown.²¹ Other studies have shown that peripheral parasitemia at any stage of the pregnancy was significantly correlated with placental infection at delivery.^{22,23} Additionally, studies have indicated that peripheral and placental parasitemia decrease with increasing parity among pregnant women.^{24,25} It has been observed that pregnant women, especially primigravidae and secundigravidae, are more susceptible to malaria infections.²² Although there is increasing evidence that prevalence of

malaria infections is parity-related and primigravidae women are more susceptible to malaria than multigravidae women, this study did not show any association between malaria infection and parity. This finding may have been caused by the failure of a small sample size and the presence of LLITNs to show any association between parity or gravidity and malaria infection.

It is important to note that women with microscopically detectable placental *P. falciparum* malaria had a higher risk of delivering an LBW baby than those without detectable placental *P. falciparum* corresponding to a relative risk of 6.9, supporting the strong association between *P. falciparum*

Table 5 Comparative efficacy of uncontrolled and controlled intermittent preventive treatment during pregnancy: secondary end points in crude analysis

Finding by analysis	Uncontrolled IPTp group			Controlled IPTp group			P value
	n/N	%	95% CI	n/N	%	95% CI	
Placental malaria^a							
ITT	55/208	26.4	0.20–0.32	45/212	21.2	0.16–0.26	0.21
PP	12/165	7.3	0.03–0.11	7/174	4	0.01–0.07	0.19
Maternal peripheral malaria at delivery							
ITT	32/208	15.3	10.4–20.1	33/212	15.5	10.6–20.3	0.95
PP	10/186	5.3	02.0–08.5	07/186	3.7	00.9–06.4	0.45
Moderate anemia^b at delivery							
Primigravid	26/51	51	0.37–0.69	29/57	50.9	0.38–0.64	1
Secundigravid	28/52	53.9	0.40–0.68	13/33	39.4	0.22–0.56	0.19
Multigravid	30/62	48.4	0.36–0.60	38/84	45.2	0.44–0.66	0.71
Total	84/165	50.9	0.41–0.57	80/174	46	0.39–0.53	0.37
Severe anemia^c at delivery							
Primigravid	9/51	17.7	0.07–0.29	6/57	10.5	0.03–0.19	0.29
Secundigravid	9/52	17.3	0.07–0.27	3/33	9.1	–1.68–1.86	0.35
Multigravid	6/62	9.7	0.03–0.17	8/84	9.5	–1.67–1.87	0.92
Total	24/165	14.6	0.10–0.20	17/174	9.8	–1.67–1.87	0.18

Notes: ^aDefined as the presence of asexual-stage parasites in the placental impression; ^bdenoted by a hemoglobin level of <11 g/dL; ^cdenoted by a hemoglobin level of <8 g/dL. Data represent number of deliveries for which placental malaria, anemia, or severe anemia was detected/number of deliveries analyzed (% of deliveries for which placental malaria, anemia, or severe anemia was detected). P values were determined by chi-squared or Fisher's exact test as appropriate. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Abbreviations: CI, confidence interval; IPTp, intermittent preventive treatment during pregnancy; ITT, intention-to-treat analysis (missing data included); PP, per-protocol analysis.

Table 6 Pregnancy outcomes

Finding by analysis	Uncontrolled IPTp Group			Controlled IPTp Group			P value
	n/N	%	95% CI	n/N	%	95% CI	
Premature delivery^a							
ITT	26/208	12.5	0.08–0.16	30/212	14.2	0.09–0.19	0.61
PP	5/165	3	0.00–0.06	8/174	4.6	0.02–0.08	0.45
Spontaneous abortion^b							
ITT	27/208	13	0.08–0.18	27/212	12.7	0.08–0.18	0.92
PP	7/165	4.2	0.01–0.17	5/174	2.9	0.00–0.06	0.49
Stillbirth^c							
ITT	33/208	15.9	0.11–0.21	35/212	16.5	0.11–0.21	0.86
PP	6/165	3.6	0.01–0.07	8/174	4.6	0.02–0.08	0.65

Notes: ^aDefined as birth at less than 37 weeks' gestation, according to the Ballard score; ^bdefined as the expulsion of a fetus before 28 weeks' gestation; ^cdefined as the delivery of a dead child after 28 weeks' gestation. P values were determined by chi-squared or Fisher's exact test as appropriate. $P < 0.05$ was considered statistically significant. **Abbreviations:** CI, confidence interval; IPTp, intermittent preventive treatment during pregnancy; ITT, intention-to-treat analysis; PP, per-protocol analysis.

malaria and the risk of LBW.²⁴ There was no difference in terms of LBW between the two groups, although more pregnant women with malaria episodes were seen in the uncontrolled group.

The results showed no statistically significant difference between the controlled and uncontrolled groups regarding the prevalence of LBW and anemia at delivery. The results are consistent with efficacy results reported from several sub-Saharan African countries^{17,18,26–28} in regard to the prevalence of LBW and severe anemia in the controlled IPTp group.

In contrast, results from Gambia show a lower prevalence of LBW compared to the present study.²⁹ The lack of difference between the two groups in the prevalence of LBW and severe anemia could be explained by the fact that SP was provided to the women in the uncontrolled group with a recommendation to take the drug at home. However, it has been demonstrated that a highly efficacious intervention given under strict trial conditions rarely translates into

an equally effective intervention when implemented under programmatic conditions.^{30–32} There are many factors that have the potential to influence the relative implementability of interventions including: the complexity of the interventions,³³ the capacity of the health system and health providers to deliver the interventions at the scale required, and the acceptability of the interventions to providers and users.

During the study, SP was not always available at pharmacy sites and clean cups and water were also not available to administer the drugs. The women should buy their drugs at an external pharmacy and take the drugs at home. Regular availability of SP in the health facility is an important factor in improving the use of IPTp and implementation of the DOT scheme.^{12,13} SP for IPTp in public hospitals in Côte d'Ivoire was supplied by the Ministry of Health. However, periodic supply shortages were frequently reported. The other main constraints to practicing DOT were lack of clean water and cups at ANC clinics.¹² Good quality services at ANC clinics

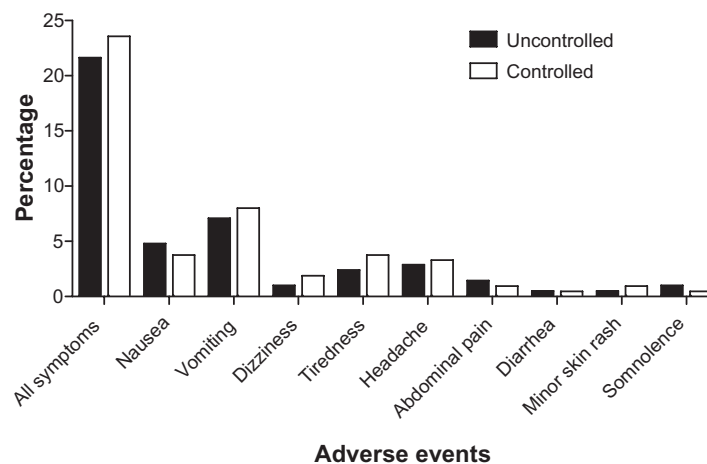


Figure 2 Proportion and type of adverse event. The most common complaints were nausea, vomiting, tiredness, and headache. There was no significant difference between the two groups ($P > 0.05$). P values were determined by chi-square or Fisher's exact test as appropriate.

are necessary to promote high coverage and to achieve actual and perceived health benefits for mothers and their children. Allowing pregnant women to take the IPTp drug unsupervised, either at the clinic or at home, makes compliance uncertain and undermines the essence of IPTp.

HIV infection is known to be associated with an increased risk of malaria and LBW, and it may have affected the occurrence of LBW and maternal anemia.³⁴ HIV may have acted as a confounder in the present study. In the clinical trial sites, HIV screening was routinely undertaken by the National HIV Control Program during the trial, but the HIV status was only determined for 60% of the women. However, the overall prevalence of HIV infection in the present study area was 4%.³⁵ Even though bed nets are not traditionally used in this area, the delivery of LLITN through ANC was well accepted and compliance with their use was very high according to the questionnaire taken at enrollment. These results cannot be attributed to IPTp-SP alone as ITNs appeared to be an important variable in determining the efficacy of IPTp. Some studies on the combined use of ITNs and IPTp demonstrated the evidence of effectiveness of these interventions when used in combination.^{36,37} It is possible that if an effective ITN is used regularly, IPTp may not be required in some populations.³⁸ Although SP is generally considered to be a safe drug when used for IPTp, it can rarely cause serious skin reactions and hematological side effects.³⁹ No serious adverse events attributable to the administration of SP were seen in this study for which the proportion of women who reported an adverse event was 24% and 22% in the controlled and uncontrolled groups.

The present study was a small, regional prospective study and therefore had certain limitations, namely, the small sample size and lack of a control group. Larger studies are needed to compare the two approaches with a control arm in the context of high resistance to SP in the country.

In conclusion, the two approaches were equivalent suggesting that unsupervised IPTp-SP free of charge should be used in areas where implementation of the DOT scheme suffers from many constraints. Encouragement of respectful communication between midwives and their patients can help to reinforce the trust relationship that exists.

Acknowledgments

The authors are grateful to the women who participated in the study and medical staff, particularly the midwives of Anonkoua-Kouté and Samo maternities. The authors would also like to acknowledge the contributions of Dr Man-Koumba Soumahoro for the multivariable analysis, Mr Ghiorghis Belai for revision of the manuscript, and

Mrs Gbaguidi Martin and Kobenan Kra who undertook central reading of the slides. The authors thank the Pasteur Institute Malaria Network for financial support.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work. All authors participated in design, implementation, analysis, or interpretation of the study. OAT was involved in all phases of the study and had full access to all the data in the study. LKP, JR, and KM participated in the design and supervised the study. CMA, NTL, AABA, AE, CB, and KD were responsible for conduction of field studies and coordination of study procedures. SD was involved in the design and the statistical analysis of data. The manuscript was drafted by OAT; substantial input came from all investigators. All authors critically reviewed the report and approved the final version of the report for submission.

References

1. World Health Organization. *A Strategic Framework for Malaria Prevention and Control During Pregnancy in the African Region*. Brazzaville: World Health Organization Regional Office for Africa; 2004.
2. World Health Organization. *Guidelines for the Treatment of Malaria*. 2nd edition. Geneva: World Health Organization; 2010.
3. Goodman CA, Coleman PG, Mills AJ. The cost-effectiveness of antenatal malaria prevention in sub-Saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;64(1-2 Suppl):45-56.
4. Newman RD, Parise ME, Slutsker L, Nahlen B, Steketee RW. Safety, efficacy and determinants of effectiveness of antimalarial drugs during pregnancy: implications for prevention programmes in *Plasmodium falciparum*-endemic sub-Saharan Africa. *Trop Med Int Health*. 2003;8(6):488-506.
5. Holtz TH, Kachur SP, Roberts JM, et al. Use of antenatal care services and intermittent preventive treatment for malaria among pregnant women in Blantyre District, Malawi. *Trop Med Int Health*. 2004;9(1):77-82.
6. Rogerson SJ, Chaluluka E, Kanjala M, Mkundika P, Mhango C, Molyneux ME. Intermittent sulfadoxine-pyrimethamine in pregnancy: effectiveness against malaria morbidity in Blantyre, Malawi, in 1997-1999. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000;94(5):549-553.
7. Ter Kuile FO, Steketee RW. Intermittent preventive therapy with sulfadoxine-pyrimethamine during pregnancy: seeking information on optimal dosing frequency. *J Infect Dis*. 2007;196(11):1574-1576.
8. Ter Kuile FO, van Eijk AM, Filler SJ. Effect of sulfadoxine-pyrimethamine resistance on the efficacy of intermittent preventive therapy for malaria control during pregnancy: a systematic review. *JAMA*. 2007;297(23):2603-2616.
9. Deloron P, Bertin G, Briand V, Massougbdji A, Cot M. Sulfadoxine/pyrimethamine intermittent preventive treatment for malaria during pregnancy. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(11):1666-1670.
10. Djaman J, Ahibo H, Yapi FH, et al. Molecular monitoring of *falciparum* malaria isolates in Côte d'Ivoire: genetic markers (dhfr-ts, dhps, pfprt, pfmdr-1) for antimalarial-drugs resistance. *Eur J Scientific Res*. 2010;40(3):461-470.
11. Djaman JA, Mazabraud A, Basco L. Sulfadoxine-pyrimethamine susceptibilities and analysis of the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of *Plasmodium falciparum* isolates from Côte d'Ivoire. *Ann Trop Med Parasitol*. 2007;101(2):103-112.

12. Akinleye SO, Falade CO, Ajayi IO. Knowledge and utilization of intermittent preventive treatment for malaria among pregnant women attending antenatal clinics in primary health care centers in rural southwest, Nigeria: a cross-sectional study. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2009;9:28.
13. Mubyazi A, Bloch P, Kamugisha M, Kitua A, Ijumba J. Intermittent preventive treatment of malaria during pregnancy: a qualitative study of knowledge, attitudes and practices of district health managers, antenatal care staff and pregnant women in Korogwe district, North-Eastern Tanzania. *Malar J*. 2005;4:31.
14. Offianan AT, Ako AA, Penali LK, et al. Efficacy of non-controlled intermittent preventive treatment in pregnant (IPTp) women in Côte d'Ivoire. Paper presented at: American Society of Tropical Medicine and Hygiene 56th Annual Meeting; November 4–8, 2007; Philadelphia, PA.
15. Vanga-Bosson HA, Coffie PA, Kanhon S, et al. Coverage of intermittent preventive treatment with sulphadoxine-pyrimethamine among pregnant women and congenital malaria in Côte d'Ivoire. *Malar J*. 2011;10:105.
16. Shute GT. The microscopic diagnosis of malaria. In: Wernsdorfer, McGregor L, editors. *Principle and Practice of Malariology*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1988:781–814.
17. Briand V, Bottero J, Noël H, et al. Intermittent treatment for the prevention of malaria during pregnancy in Benin: a randomized, open-label equivalence trial comparing sulphadoxine-pyrimethamine with mefloquine. *J Infect Dis*. 2009;200(6):991–1001.
18. Gies S, Coulibaly SO, Ouattara FT, D'Alessandro U. Individual efficacy of intermittent preventive treatment with sulphadoxine-pyrimethamine in primi- and secundigravidae in rural Burkina Faso: impact on parasitaemia, anaemia and birth weight. *Trop Med Int Health*. 2009;14(2):174–182.
19. Menendez C, Bardaji A, Sigauque B, et al. Malaria prevention with IPTp during pregnancy reduces neonatal mortality. *PLoS One*. 2010;5(2):e9438.
20. Savage EJ, Msyamboza K, Gies S, D'Alessandro U, Brabin BJ. Maternal anaemia as an indicator for monitoring malaria control in pregnancy in sub-Saharan Africa. *BJOG*. 2007;114(10):1222–1231.
21. Ofori MF, Staalsoe T, Bam V, et al. Expression of variant surface antigens by *Plasmodium falciparum* parasites in the peripheral blood of clinically immune pregnant women indicates ongoing placental infection. *Infect Immun*. 2003;71(3):1584–1586.
22. Cottrell G, Mary JY, Barro D, Cot M. Is malarial placental infection related to peripheral infection at any time of pregnancy? *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73(6):1112–1118.
23. McGready R, Davison BB, Stepniewska K, et al. The effects of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections on placental histopathology in an area of low malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;70(4):398–407.
24. Ofori M, Ansah E, Agyepong I, Ofori-Adjei D, Hviid L, Akanmori B. Pregnancy-associated malaria in a rural community of Ghana. *Ghana Med J*. 2009;43(1):13–18.
25. Shulman CE, Dorman EK. Importance and prevention of malaria in pregnancy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2003;97(1):30–35.
26. Tiono AB, Ouedraogo A, Bougouma EC, et al. Placental malaria and low birth weight in pregnant women living in a rural area of Burkina Faso following the use of three preventive treatment regimens. *Malar J*. 2009;8:224.
27. Sirima SB, Cotte AH, Konate A, et al. Malaria prevention during pregnancy: assessing the disease burden one year after implementing a program of intermittent preventive treatment in Koupela District, Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75(2):205–211.
28. Le Port A, Cottrell G, Dechavanne C, et al. Prevention of malaria during pregnancy: assessing the effect of the distribution of IPTp through the national policy in Benin. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84(2):270–275.
29. Mbaye A, Richardson K, Balajo B, et al. A randomized, placebo-controlled trial of intermittent preventive treatment with sulphadoxine-pyrimethamine in Gambian multigravidae. *Trop Med Int Health*. 2006;11(7):992–1002.
30. Abdella YM, Deribew A, Kassahun W. Does insecticide treated mosquito nets (ITNs) prevent clinical malaria in children aged between 6 and 59 months under program setting? *J Community Health*. 2009;34(2):102–112.
31. Crawley J, Hill J, Yartey J, et al. From evidence to action? Challenges to policy change and programme delivery for malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(2):145–155.
32. Yeung S, White NJ. How do patients use antimalarial drugs? A review of the evidence. *Trop Med Int Health*. 2005;10(2):121–138.
33. Gericke CA, Kurowski C, Ranson MK, Mills A. Intervention complexity – a conceptual framework to inform priority-setting in health. *Bull World Health Organ*. 2005;83(4):285–293.
34. Filler SJ, Kazembe P, Thigpen M, et al. Randomized trial of 2-dose versus monthly sulphadoxine-pyrimethamine intermittent preventive treatment for malaria in HIV-positive and HIV-negative pregnant women in Malawi. *J Infect Dis*. 2006;194(3):286–293.
35. HIV Control Ministry, National Institute of Statistics, RETROCI. *Enquête sur les Indicateurs du Sida, Côte d'Ivoire 2005* [Survey on AIDS indicators, Ivory Coast 2005]. Calverton, MD: ORC Macro; 2007. French.
36. Kabanyanyi AM, MacArthur JR, Stolk WA, et al. Malaria in pregnant women in an area with sustained high coverage of insecticide-treated bed nets. *Malar J*. 2008;7:133.
37. Nganda RY, Drakeley J, Reyburn H, Marchant T. Knowledge of malaria influences the use of insecticide treated nets but not intermittent presumptive treatment by pregnant women in Tanzania. *Malar J*. 2004;3:42.
38. Menendez C, Bardaji A, Sigauque B, et al. A randomized placebo-controlled trial of intermittent preventive treatment in pregnant women in the context of insecticide treated nets delivered through the antenatal clinic. *PLoS One*. 2008;3(4):e1934.
39. Peters PJ, Thigpen MC, Parise ME, Newman RD. Safety and toxicity of sulphadoxine/pyrimethamine: implications for malaria prevention in pregnancy using intermittent preventive treatment. *Drug Saf*. 2007;30(6):481–501.

Infection and Drug Resistance

Publish your work in this journal

Infection and Drug Resistance is an international, peer-reviewed open-access journal that focuses on the optimal treatment of infection (bacterial, fungal and viral) and the development and institution of preventive strategies to minimize the development and spread of resistance. The journal is specifically concerned with the epidemiology of antibiotic

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/infection-and-drug-resistance-journal>

Dovepress

resistance and the mechanisms of resistance development and diffusion in both hospitals and the community. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Assessment of the efficacy of first-line antimalarial drugs after 5 years of deployment by the National Malaria Control Programme in Côte d'Ivoire

This article was published in the following Dove Press journal:
Open Access Journal of Clinical Trials
8 November 2011
[Number of times this article has been viewed](#)

Andre T Offianan¹
Serge B Assi²
Aristide MA Coulibaly¹
Landry T N'guessan¹
Aristide A Ako¹
Florence K Kadjo²
Moïse K San²
Louis K Penali²

¹Malariology Department, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Abidjan, Côte d'Ivoire; ²National Malaria Control Programme, Abidjan, Côte d'Ivoire

Background: The emergence of artemisinin resistance has raised concerns that the most potent antimalarial drug may be under threat. Artesunate + amodiaquine (ASAQ) and artemether-lumefantrine (AL) are respectively the first- and second-line treatments for uncomplicated falciparum malaria in Côte d'Ivoire. A comparison of the efficacy and safety of these two drug combinations was necessary to make evidence-based drug treatment policies.

Methods: In an open-label, non inferiority, randomized, controlled clinical trial, children aged 6–59 months were randomized to receive ASAQ or AL. Both drug regimens were given for 3 days, and follow-up was for 28 days. The primary endpoint was the 28-day cure rates and was defined as proportion of patients with polymerase chain reaction (PCR)-corrected cure rate after 28 days of follow-up.

Findings: A total of 251 patients who were attending the Ayame and Dabakala hospitals and presenting with symptomatic acute uncomplicated falciparum malaria were randomized to receive ASAQ (128) and AL (123). The intention-to-treat analysis showed effectiveness rates of 94.5% and 93.5% for ASAQ and AL, respectively on day 28. After adjustment for PCR results, these rates were 96.1% and 96.8%, respectively. On day 28, the per-protocol analysis showed effectiveness rates of 98.4% and 96.6% for ASAQ and AL, respectively. After adjustment by PCR for reinfection, these rates were 100% for each drug, and both regimens were well tolerated.

Conclusion: ASAQ and AL remain efficacious treatments of uncomplicated falciparum malaria in Ivorian children 5 years after adoption. The efficacy of ASAQ and AL in Côte d'Ivoire requires, therefore, continuous monitoring and evaluation.

Keywords: artesunate, amodiaquine, artemether-lumefantrine, ASAQ, AL

Introduction

Multidrug resistance of *Plasmodium falciparum* is a major health problem in many countries, and the number of drugs available that are effective and affordable is very low.¹

Currently, artemether-lumefantrine (AL) and artesunate-amodiaquine (ASAQ) are the only widely available drugs, which are recommended by most malaria endemic countries in the treatment of uncomplicated falciparum malaria.¹ The emergence of artemisinin-resistant malaria along the Thai–Cambodian border, historically a site of emerging antimalarial-drug resistance, has provoked global alarm that the most valuable and effective antimalarial drug is in danger of being lost, triggering a campaign to identify and eradicate resistant parasite strains.^{2–6} Other suspected foci have been identified in the Greater Mekong subregion but are not yet confirmed.⁷ The high persistence of substandard artemisinin combined therapies (ACTs) and inappropriate

Correspondence: Andre T Offianan
Malariology Department, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, PO Box 490, Abidjan 01, Côte d'Ivoire
Tel +225 22 44 84 25
Fax +225 22 48 53 05
Email andre_offianan@yahoo.fr

artemisinin monotherapies in the private sector, especially in sub-Saharan Africa (where many individuals buy their treatments privately), risks patient safety, and through drug resistance, places the future of malaria treatment at risk globally.^{8–11} Several of these ACTs are currently available in Côte d'Ivoire, where ASAQ and AL combinations are common.

AL offers excellent efficacy, but in high-transmission areas, the relatively short half-life of lumefantrine leads to a high incidence of new infections soon after therapy.^{12,13} ASAQ has shown a significantly lower efficacy than has AL in East Africa,^{14,15} presumably due to the high prevalence of amodiaquine-resistant parasites in this region.

As resistance to sulfadoxine-pyrimethamine (SP) increases and spreads across Africa,^{16–18} the effectiveness of the intermittent preventive treatment in pregnancy (IPTp) strategy may be compromised in many malaria-endemic countries.¹⁹ Clinical trials are being conducted to assess alternative drugs that could be used for IPTp in place of SP. Artemisinin-based IPT regimens represent a promising potential alternative to SP. The World Health Organization (WHO) endorses the use of ACT for patients in the second and third trimesters of pregnancy with acute uncomplicated falciparum malaria.¹ Artemisinin resistance would be disastrous for global malaria control. In Côte d'Ivoire, ASAQ and AL have been recommended respectively in first- and second-line treatment since 2005 following earlier studies.^{20–22} But continued use of amodiaquine or artesunate monotherapies, persistence of substandard ACTs in the private sector,^{10–11,23} and resistance to artesunate and/or amodiaquine²⁴ may jeopardize the future use of ASAQ and AL as an effective artemisinin-based combination therapy. The emergence of artemisinin resistance may also compromise the future use of artemisinin derivatives as potential alternatives to SP for IPTp.

The main purpose of this study was to update the baseline data from two randomized clinical trial sites assessing the safety and efficacy of ASAQ fixed-dose combination tablets in comparison with a fixed-dose combination of AL, the two drug combinations recommended by the National Malaria Control Programme (Abidjan, Côte d'Ivoire) before deployment of these two ACTs in the 19 districts. The Global Fund (Round 6) has provided funding for ASAQ and AL in Côte d'Ivoire for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in children less than 5 years old.

Patients, materials, and methods

Study design

This study was a randomized, open-label, noninferiority clinical trial comparing ASAQ (Coarsucam®; Sanofi-Aventis,

Paris, France) and AL (Artrin®; Lic Pharma, Abidjan, Côte d'Ivoire). The study was carried out according to current WHO protocol.²⁵

Study area

This trial was performed from November 2008 through February 2009 at two health care centers in Ayame (southern) and Dabakala (northern), Côte d'Ivoire. *P. falciparum* transmission is intense and perennial, with recrudescence during the rainy season. *P. falciparum* is the predominant malaria-causing species.

Study population

Children presenting at the site were screened for eligibility and invited to participate in the study if they met the following inclusion criteria: aged 6–59 months; body weight ≥ 5 kg; a history of fever in the previous 24 hours or measured fever (axillary temperature $\geq 37.5^\circ\text{C}$); monoinfection with *P. falciparum*, with density parasitemia in the range of 2000–200,000 asexual parasites per microliters of blood; no other cause of fever than suspected malaria; and no general danger signs or signs of severe and complicated falciparum malaria as per WHO guidelines,²⁵ were able to take study drugs by the oral route, were able to attend clinic on stipulated days for follow-up, and if a parent or guardian provided written informed consent for the child to participate in the study.

Exclusion criteria consisted of: presence of severe and complicated malaria as defined by WHO; a mixed plasmodial infection, or concomitant disease masking assessment of the response to antimalarial treatment; intake of antimalarial drugs other than chloroquine within the past 7 days; and known hypersensitivity to any of the investigative combinations.

Randomization and treatment

Patients were randomly assigned to one of two treatment groups, namely ASAQ once daily intake and AL twice daily.

Treatment dosages were determined according to patient's body weight. Treatment duration was 3 days. Treatment with ASAQ (one tablet once daily for 3 days) was provided as 25 mg/67.5 mg tablets for children who weighed 5–9 kg, 50 mg/135 mg tablets for children who weighed > 9–18 kg, and 100 mg/270 mg tablets for children who weighed > 18 kg.

Treatment in the AL group was provided as 20 mg/120 mg tablets, given in a 3-day, 6-dose regimen. Children who weighed 5–15 kg received one tablet per dose, and children who weighed > 15–20 kg were given two tablets per dose.

The first dose was taken at enrolment, the second dose 8 hours later on day 0, and then two doses at 12-hourly intervals for the subsequent 2 days. All tablets were either swallowed whole or crushed with water. Yoghurt was then given to the children. The drug administration was supervised by the research team.

Randomization was done by an independent statistician using computer-allocated blocks of ten and was not stratified. Individual treatment allocations were contained inside consecutively numbered sealed envelopes, which were opened sequentially by a study investigator or clinical research coordinator after the decision to enroll a subject had been made by the study team. In the case where a participant vomited the first dose within 30 minutes of drug administration, a repeat full dose was re-administered. If vomiting persisted, the child was withdrawn from the study. A participant who was withdrawn due to vomiting received rescue medication according to the Malaria Control Programme guidelines.

Blinding

Although initial treatment allocation was blinded, administration of subsequent medication was not (ie, open-label). However, laboratory staff reading the malaria smears had no idea of the treatment received. All additional sample investigation such as polymerase chain reaction (PCR) genotyping was performed by individuals who were also blinded to the treatment allocation.

Efficacy and safety assessment

The patients returned on days 1, 2, 3, 7, 14, 21, and 28 to complete the drug administration and for clinical assessment, blood smears, and filter paper blood sample collection. Patients who failed to report at the clinic for the scheduled visit were followed to their residence by trial field workers.

They were also asked to return to the clinic on any other day if they had new complaints or any change in their condition. Clinical efficacy was assessed by grading the pre-existing clinical signs and combining them with the temperature values. The following clinical symptoms were assessed systematically: fever, perspiration, headache, chills, pain (specifying topography), jaundice, asthenia, dizziness, anorexia, skin fold, skin rash, hepatomegaly, pruritus. Splenomegaly was estimated according to the Hackett scale.²⁶ Parasitological efficacy was based on asexual parasitemia and gametocyte carriage.

The classification of the therapeutic outcome was done according to the current 28-day WHO protocol.²⁵ The primary endpoint was the 28-day cure rates and was defined

as the proportion of patients with PCR-corrected adequate clinical and parasitological response (ACPR) after 28 days of follow-up. Secondary endpoints were clinical adverse events (AEs), clearance rate of fever and parasitemia, and gametocyte carriage.

All AEs were monitored passively and actively. An AE was defined as any unfavorable and unintended sign, symptom, or disease temporarily associated with the use of an investigational product, not present on day 0, but occurring during follow-up, or was present on day 0 but became worse during follow-up.

Sample size

The sample size was calculated using the WHO guidelines on assessment of antimalarial drugs.²⁵ The population size was determined according to the following criteria: the proportion of probable clinical failures with the antimalarial combinations studied should not be higher than 10%, for a level of confidence of 95% and a precision of 10%, taking into account patients who were excluded or lost to follow-up. Using these criteria, a minimum of 50 patients was required in each treatment arm per site.

Laboratory procedures

At enrolment and subsequent days of follow-up, thick and thin blood films were collected. Blood smears were stained with Giemsa 10% and were examined at magnification 100× (oil immersion). Density parasitemia was measured by counting the number of asexual parasites against a number of leukocytes in the thick blood film, based on a putative count of 8000 leukocytes per microliter of blood. The number of asexual parasites was counted against 200 leukocytes using a hand tally counter. If *P. falciparum* gametocytes were seen, a gametocyte count was performed against 1000 leukocytes. Counts were performed by two independent microscopists; discrepant readings were resolved by a third reader.

Blood spots on Whatman 3M filter paper were prepared for PCR genotyping. Multiplicity of infection was assessed using three polymorphic loci (merozoite surface proteins 1 and 2 and glutamate-rich).²⁷ Briefly, filter paper blood samples collected on the day of enrolment and on the day of failure were analyzed for polymorphism of merozoite surface protein-1 (*mSP-1*) and merozoite surface protein-2 (*mSP-2*) using nested-PCR as previously described.²⁸ Possible outcomes were new infection or recrudescence. A “new infection” is a subsequent occurring parasitemia in which all the alleles in parasites from the post-treatment sample are different from those in the admission sample, for one or more loci

tested. In a “recrudescence,” at least one allele at each locus should be in common for both paired samples.²⁷

Statistical analysis

Data generated were recorded in a log book and individual participants case record files. Data were entered and analyzed with EPI-Info™ software (v 6.4; Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA). Analysis of treatment outcome was intention-to-treat (ITT) and per protocol.

Per-protocol analysis included all patients who matched all inclusion criteria, were properly randomized, had received the study drugs according to the protocol, and for whom data were available on the study endpoint without protocol violation during the follow-up time. ITT analysis comprised all randomized patients fulfilling the inclusion criteria without repeated vomiting after the first study drug administration.

Frequencies were compared by either chi-squared or Fisher’s exact tests, as appropriate, and continuous variables

by Student’s *t*-tests when the data are normally distributed. No normally distributed data were transformed to normality.

Ethical issues

The study was conducted according to the Declaration of Helsinki and national legal and regulatory requirements. The protocol was submitted and approved by the national ethics committee. Written informed consent was obtained from the parent or guardian. If parents or guardian were unable to sign, a fingerprint was applied on the consent form. If the parents or guardian were unable to read, the informed consent form was read and explained in the appropriate language. In such cases, the presence of a witness who also signed the consent form to confirm that the patient had freely given consent was required.

Results

Participant characteristics

Between November 2008 and February 2009, out of 624 children under 5 years of age who were screened for

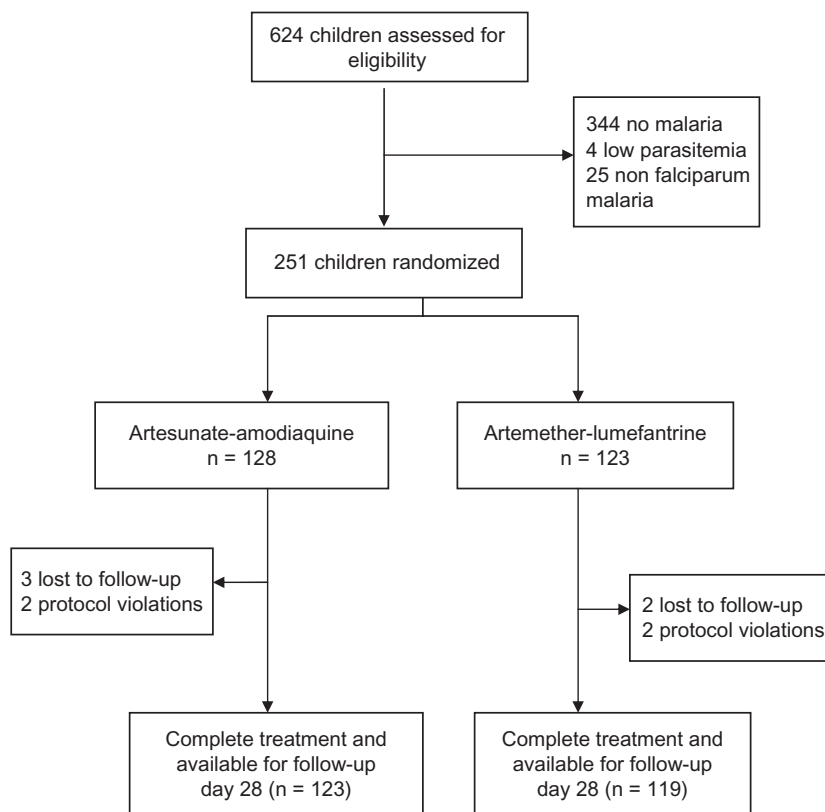


Figure 1 Trial profile.

malaria symptoms, 251 were enrolled. Figure 1 shows detailed enrolment and follow-up information. Of the 251 enrolled participants, 128 were assigned to ASAQ and 123 to AL.

A total of 123 and 119 patients of the ASAQ and AL, respectively, completed the trial and had adequate data for the analysis of the endpoints. Table 1 shows the baseline characteristics of the eligible participants. The two treatment groups were comparable in all characteristics.

Clinical and parasitological responses to treatment

As shown in Table 2, the 28-day cure rates were 94.5% (121 of 128) and 93.5% (115 of 123) for participants receiving ASAQ and AL, respectively ($P = 0.73$). After adjusting for cases of reinfection, the 28-day cure rates were 96.1% (123 of 128) and 96.8% (119 of 123) for those receiving ASAQ and AL, respectively.

The per-protocol analysis showed effectiveness rates on day 28 of 98.4% and 96.6% for ASAQ and AL, respectively ($P = 0.44$). After adjustment by PCR for reinfection, these rates were 100% for each drug.

Fever and parasite clearance and gametocyte carriage

As shown in Figure 2, the proportion of participants without fever was similar on days 2 and 3. On day 2, the fever clearance rates were 77.2% (95 of 123) and 73.9% (88 of 119) in the ASAQ and AL groups, respectively ($P = 0.55$), while on day 3, these rates were 82.1% (101 of 123) and 81.5% (97 of 119).

Both treatments resulted in rapid clearance of parasites (Figure 3) as parasite clearance rates on day 2 were 100% (123 of 123) and 99.2% (118 of 119) in the ASAQ and AL groups, respectively.

At enrolment, gametocytes were detected in the peripheral blood of eight patients: three in the ASAQ group and five in the AL group. On day 3, three patients of each group

had gametocytes. All patients were free of gametocytes from day 7 to day 28 (Figure 4).

PCR findings

All six patients (two in the ASAQ group and four in the AL group) who were parasitemic during follow-up had their samples analyzed at enrolment and post-treatment. Parasite genotypes in the pre- and post-treatment samples were nonidentical in all patients and were considered as newly acquired infections.

AEs

Assessment of AEs was made difficult by the predominance of background signs and symptoms of malaria and the age of the participants. Common AEs recorded (ITT population) were vomiting, nausea, diarrhea, asthenia, and abdominal pains. All of these events were described as mild or moderate. Table 3 shows details of the distribution of AEs recorded during the study.

Discussion

Artemisinins are established antimalarial agents with an excellent safety profile,²⁹ and ACTs are the recommended first-line treatments of falciparum malaria in all countries with endemic disease.¹ There are recent concerns that the efficacy of such therapies has declined on the Thai–Cambodian border.^{7,30,31} In Côte d'Ivoire, more than 100 combinations are registered and marketed and widely available on street markets as poor-quality byproducts. Parasite resistance to amodiaquine alone was also well established in most African countries.^{24,32,33} Overall, there are concerns about the efficacy of registered treatments, especially ASAQ.

In the present study, the efficacy and safety of ASAQ and AL in the treatment of acute uncomplicated malaria in Ivorian children aged 6–59 months were thus compared. ASAQ administered once daily for 3 days was as effective as the six-dose regimen of AL given twice daily for 3 days.

Table 1 Baseline characteristics in the intention-to-treat cohort

Characteristic	ASAQ	AL	P value
Mean age (range)	31.24 (6–59)	34.41 (7–59)	0.18
Female sex, n (%)	60 (68)	58 (65)	1 ^a
Mean weight, kg (range)	12.06 (5.4–19.0)	12.49 (6.5–20.0)	0.43 ^b
Mean temperature, °C (range)	38.61 (36–41)	38.12 (36.4–40.7)	0.0005 ^b
GM parasite count, μ L (range)	30,487 (2000–171,152)	24,901 (2000–127,040)	0.22 ^b

Notes: ^achi-squared test; ^bStudent's *t*-test.

Abbreviations: ASAQ, artesunate + amodiaquine; AL, artemether-lumefantrine; GM, geometric mean.

Table 2 Treatment outcome of ASAQ and AL at day 28

Outcome	ASAQ	AL	P value
Intention to treat analysis			
Enrolled patients	128	123	
Patients seen at day 28	123/128 (96.1%)	119/123 (96.8%)	1
Missing	5/128 (3.9)	4/123 (3.2%)	1
Crude failure rate at day 28	7/128 (5.5%)	8/123 (6.5%)	0.73
Crude cure rate at day 28	121/128 (94.5)	115/123 (93.5)	0.73
PCR adjusted failure rate at day 28	5/128 (3.9%)	4/123 (3.2%)	1
PCR adjusted cure rate at day 28	123/128 (96.1%)	119/123 (96.8%)	1
Per protocol analysis			
Patients seen at day 28	123	119	
Crude failure rate at day 28	2/123 (1.6%)	4/119 (3.4%)	0.44
Crude cure rate at day 28	121/123 (98.4%)	115/119 (96.6%)	0.44
PCR adjusted failure rate at day 28	0/123 (0%)	0/119 (0%)	1
PCR adjusted cure rate at day 28	123/123 (100%)	119/119 (100%)	1

Note: P values were obtained by Fisher's exact test.

Abbreviations: AL, artemether-lumefantrine; ASAQ, artesunate + amodiaquine; PCR, polymerase chain reaction.

The results showed a high cure rate for both regimens after a standard 28-day follow-up. These results are consistent with efficacy results reported from several sub-Saharan African countries,³⁴⁻³⁶ indicating a high overall cure rate with these regimens in the short term (28-day). Therefore, the data are in line with studies conducted in Ghanaian children showing lower parasitological and clinical failure rates in the ASAQ compared with the AL arm.³⁷⁻³⁹ In contrast, results from Central and East Africa show higher efficacy of AL

than ASAQ, especially a higher potency in preventing reinfections.^{14,40} In the present study, both treatments were equivalent regarding parasite and fever clearance rates and gametocyte carriage. As already described,²⁹ ACTs triggered a rapid asexual parasite clearance in the present cohort. Delay in parasite clearance (>2 days) only occurred in one child of the AL group which could suggest decreased sensitivity.⁴¹ The results of this present study suggest full sensitivity of *P. falciparum* in vivo to ACTs in the area of study.

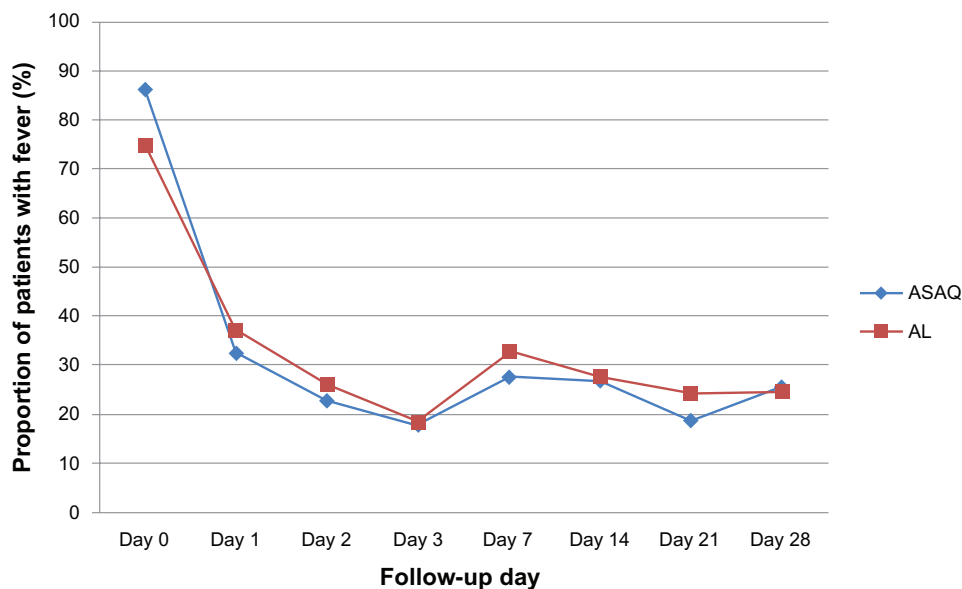


Figure 2 Fever clearance in the two groups.

Note: No significant differences were found for the proportions of subjects with fever between the two treatment regimens from baseline to day 28 ($P > 0.05$ Fisher's exact test or chi-squared test as appropriate).

Abbreviations: AL, artemether-lumefantrine; ASAQ, artesunate + amodiaquine.

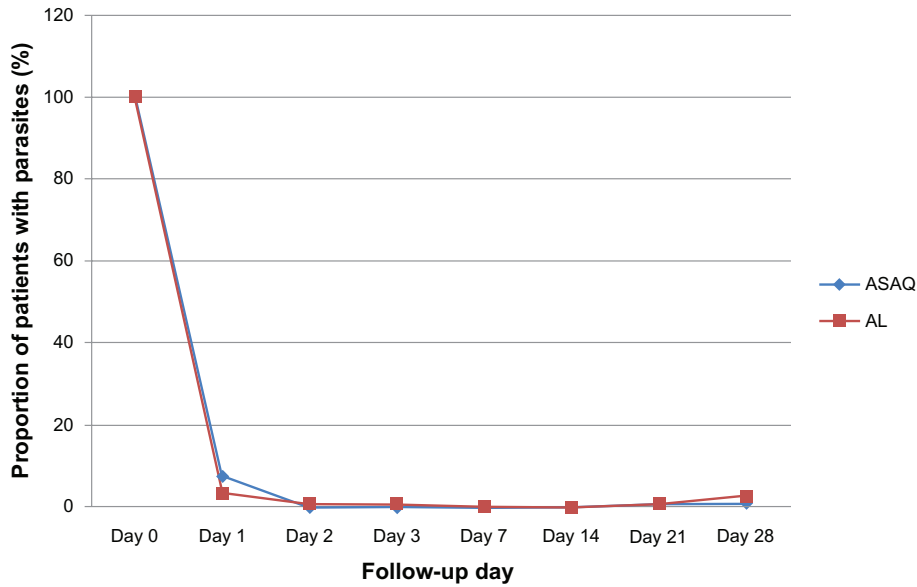


Figure 3 Parasite clearance in the two groups.
Note: The proportion of participants who were aparasitemic was similar between the two treatment arms: 100% and 99% ($P = 0.49$) for those receiving ASAQ or AL, respectively, on day 2. On day 3 these rates were also 100% (123 of 123) and 99% (118 of 119) in the ASAQ and AL groups respectively ($P = 0.49$).
Abbreviations: AL, artemether-lumefantrine; ASAQ, artesunate + amodiaquine.

A limitation of the study is the restriction of the follow-up period to 28 days bearing the risk of underestimation of treatment failures. Although logistically difficult, only longitudinal clinical trials with follow-up time over several months are appropriate for comparing the benefits and risks

of different antimalarial drugs, especially in highly endemic areas.⁴² It has been estimated⁴³ that 28-day assessments underestimate the true failure by about 20% for drugs with intermediate elimination half-life, such as lumefantrine and SP (3–6 days half-life),⁴⁴ and as much as 40% for drugs with

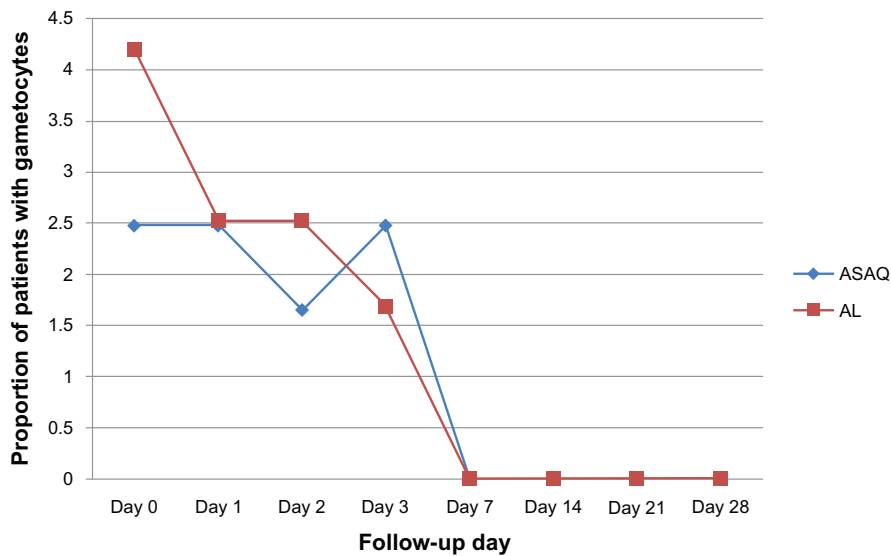


Figure 4 Proportion of patients with gametocytes during follow-up.
Abbreviations: AL, artemether-lumefantrine; ASAQ, artesunate + amodiaquine.

Table 3 Clinical adverse events in the intention-to-treat population

Adverse event	ASAQ		AL		P value
	N = 128	%	N = 123	%	
Asthenia	18	14.06	6	4.88	0.01
Anorexia	5	3.91	2	3.25	0.45
Spitting	12	9.38	7	5.69	0.27
Vomiting	8	6.25	4	3.25	0.38
Diarrhea	6	4.69	3	2.44	0.50
Abdominal pain	10	7.81	4	3.25	0.17
Nausea	15	11.72	10	8.13	0.34

Notes: The most commonly reported and possibly drug-related adverse events to both combination therapies were gastrointestinal effects (abdominal pain, anorexia, diarrhea, and late vomiting); P values were obtained by Fisher's exact test.

Abbreviations: AL, artemether-lumefantrine; ASAQ, artesunate + amodiaquine.

a longer elimination half-life, such as desethylamodiaquine, the active metabolite that amodiaquine quickly metabolizes into (1–3 weeks half-life).⁴⁵ In this case, the true failure rates may have been higher. A trial comparing ASAQ and AL was performed in Ghana with a follow-up time of 1 year showing high day-28 ACPRs of 95.3% and 94.2%, respectively, with no difference in the occurrence of reinfections or AEs.⁴⁶ However, the differentiation between reinfection and resistance is even more difficult with increasing follow-up periods.

In the present study, the most common AEs were vomiting, nausea, diarrhea, asthenia, and abdominal pains. These are common clinical symptoms among patients with malaria. It is thus difficult to confidently classify them as drug-related AEs.

Both ACTs were not only efficacious but well tolerated. No study participant was withdrawn as a result of recurrent vomiting. In addition, there was no incidence of any serious AE in the two treatment groups. The incidence of gastrointestinal AEs was higher in the ASAQ group compared with the AL group. These findings are in agreement with previous drug safety monitoring.^{32–34} This may suggest a lower intrinsic tolerance of ASAQ.

Another limitation of this study is its limited statistical power to detect rare side effects, as well as the difficulties associated with evaluating neurological function in children below 5 years of age.

The two ACTs showed a good safety profile and were well tolerated. ASAQ and AL remain efficacious treatments of uncomplicated falciparum malaria in Ivorian children, and significant drug resistance does not seem to have emerged after 5 years of adoption as first- and second-line treatments. The Global Fund has provided funding for ASAQ and AL in Côte d'Ivoire to treat uncomplicated falciparum malaria

in children. Correct deployment of ACTs remains now a major challenge.

Authors' contributions

All authors participated in the design, implementation, and analysis or data interpretation of the study. OAT and AS were involved in all phases of the study and have full access to all the data in the study. LKP and SK were the principal investigators and supervised the study. CMA an NTL were responsible for conduction of field studies and coordination of study procedures. Analysis of data was led by AAA. The manuscript was drafted by OAT; substantial input came from all investigators. All authors critically reviewed the report and approved the final version of the report for submission.

Acknowledgments

The authors thank the patients and their parents and guardians who agreed to participate in this study, and also thank all health authorities in the study sites for collaboration.

The assistance of the following personnel is gratefully acknowledged for their assistance during the trial: Drs Pode, Offo, and Dafless from Dabakala and Drs Diokouri Anne, Kouame, and M'Bo Jeanne from Ayame. The authors would also like to acknowledge the contributions of Drs Ronan Jambou and Demba Sarr who provided writing assistance, Mr Ghiorghis Belai for revision of the manuscript, and Mrs Gbaguidi Martin and Kobenan Kra who undertook central reading of the slides.

Disclosure

The Global Fund sponsored this trial. The authors report no conflicts of interest in this work.

References

1. World Health Organization (WHO). Guidelines for the Treatment of Malaria. 2nd ed. Geneva, Switzerland: WHO; 2010. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547925_eng.pdf. Accessed September 10, 2010.
2. Enserink M. Malaria's drug miracle in danger. *Science*. 2010;328(5980):844–846.
3. White NJ. Artemisinin resistance – the clock is ticking. *Lancet*. 2010;376:2051.
4. World Health Organization (WHO). *Global Report on Antimalarial Efficacy and Drug Resistance: 2000–2010*. Geneva, Switzerland: WHO; 2010. Available from: <http://who.int/malaria/publications/atoz/9789241500470/en/index.html>. Accessed May 14, 2011.
5. Dondorp AM, Yeung S, White L, et al. Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(4):272–280.
6. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med*. 2009;361(5):455–467.

7. World Health Organization (WHO). *Global Plan for Artemisinin Resistance Containment (GPARC)*. Geneva, Switzerland: WHO; 2011. Available from: http://www.who.int/malaria/publications/atoz/artemisinin_resistance_containment_2011.pdf. Accessed May 29, 2011.
8. Newton PN, Fernández FM, Green MD, Primo-Carpenter J, White NJ. Counterfeit and substandard anti-infectives in developing countries. *Antimicrobial Resistance in Developing Countries*. 2010;(Pt 4): 413–443.
9. Goodman C, Brieger B, Unwin A, et al. Medicine sellers and malaria treatment in sub-Saharan Africa: what do they do and how can their practice be improved? *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77(6):203–218.
10. Granado S, Obrist B, Manderson L, Tanner M. The moment of sale: treating malaria in Abidjan, Côte d'Ivoire. *Anthropol Med*. 2009;16(3): 319–331.
11. Aka E, Legris C, Tanimoto T, Matsushita R, Kimura K. Counterfeit medicine detection by authenticity investigation: a pilot study in the street market of Côte d'Ivoire. *Jpn Soc Soc Pharm*. 2005;24:7–16.
12. Kanya MR, Yeka A, Bukirwa H, et al. Artemether-lumefantrine versus dihydroartemisinin-piperazine for treatment of malaria: a randomized trial. *PLoS Clin Trials*. 2007;2:e20.
13. Yeka A, Dorsey G, Kanya MR, et al. Artemether-lumefantrine versus dihydroartemisinin-piperazine for treating uncomplicated malaria: a randomized trial to guide policy in Uganda. *PLoS One*. 2008;3:e2390.
14. Dorsey G, Staedke S, Clark TD, et al. Combination therapy for uncomplicated falciparum malaria in Ugandan children: a randomized trial. *JAMA*. 2007;297:2210–2219.
15. Mutabingwa TK, Anthony D, Heller A, et al. Amodiaquine alone, amodiaquine + sulfadoxine-pyrimethamine, amodiaquine + artesunate, and artemether-lumefantrine for outpatient treatment of malaria in Tanzanian children: a four-arm randomised effectiveness trial. *Lancet*. 2005;365:1474–1480.
16. Harrington WE, Mutabingwa TK, Muehlenbachs A, et al. Competitive facilitation of drug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria parasites in pregnant women who receive preventive treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:9027–9032.
17. Mockenhaupt FP, Bedu-Addo G, Eggelte TA, et al. Rapid increase in the prevalence of sulfadoxine-pyrimethamine resistance among *Plasmodium falciparum* isolated from pregnant women in Ghana. *J Infect Dis*. 2008;198:1545–1549.
18. Valley A, Valley L, Chagalucha J, Greenwood B, Chandramohan D. Intermittent preventive treatment for malaria in pregnancy in Africa: what's new, what's needed? *Malaria J*. 2007;6:16.
19. Tagbor H, Bruce J, Agbo M, Greenwood B, Chandramohan D. Intermittent screening and treatment versus intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy: a randomised controlled non-inferiority trial. *PLoS One*. 2010;5(12):e14425.
20. Faye B, Offianan AT, Ndiaye JL, et al. Efficacy and tolerability of artesunate-amodiaquine (Camoquin plus) versus artemether-lumefantrine (Coartem) against uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: multisite trial in Senegal and Ivory Coast. *Trop Med Int Health*. 2010;15(5):608–613.
21. Offianan AT, Penali LK, Yapi JD, et al. A comparative, randomized clinical trial of artemisinin/naphthoquine twice daily one day versus artemether/lumefantrine six doses regimen in children and adults with uncomplicated falciparum malaria in Côte d'Ivoire. *Malaria J*. 2009;8:148.
22. Ministry of Health/National Malaria Control Programme: Malaria policies and strategies in Côte d'Ivoire. Revised document, February 2008.
23. Tipke M, Diallo S, Coulibaly B, et al. Substandard anti-malarial drugs in Burkina Faso. *Malaria J*. 2008;7:95.
24. Yavo W, Bla KB, Djaman AJ, et al. In vitro susceptibility of *Plasmodium falciparum* to monodesethylamodiaquine, quinine, mefloquine and halofantrine in Abidjan (Côte d'Ivoire). *Afr Health Sci*. 2010;10(2): 111–116.
25. World Health Organization (WHO). *Assessment and Monitoring of Antimalarial Drug Efficacy for the Treatment of Uncomplicated Falciparum Malaria*. Volume 50. Geneva, Switzerland: WHO; 2003:1–68.
26. World Health Organization (WHO). *Malaria Terminology*. Report of a drafting committee appointed by the World Health Organization. Geneva, Switzerland: WHO Monograph Series; 1953:82.
27. World Health Organization (WHO). *Methods and Techniques for Clinical Trials on Antimalarial Drug Efficacy: genotyping to identify parasites population*. Informal consultation organized by the Medicines for Malaria Venture and cosponsored by WHO; May 29–31, 2007; Amsterdam, The Netherlands.
28. Cattamanchi A, Kyabayinze D, Hubbard A, Rosenthal PJ, Dorsey G. Distinguishing recrudescence from reinfection in a longitudinal antimalarial drug-efficacy study: comparison of results based on genotyping of msp-1, msp-2, and glurp. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;68: 133–139.
29. White NJ. Qinghaosu (artemisinin): the price of success. *Science*. 2008;320:330–334.
30. Bethell D, Se Y, Lon C, et al. Artesunate dose escalation for the treatment of uncomplicated malaria in a region of reported artemisinin resistance: a randomized clinical trial. *PLoS One*. 2011;6(5):e19283.
31. Noedl H, Se Y, Sriwichai S, et al. Artemisinin resistance in Cambodia: a clinical trial designed to address an emerging problem in Southeast Asia. *Clin Infect Dis*. 2010;51:e82–e89.
32. Tekete M, Djimde AA, Beavogui AH, et al. Efficacy of chloroquine, amodiaquine and sulphadoxine-pyrimethamine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria: revisiting molecular markers in an area of emerging AQ and SP resistance in Mali. *Malaria J*. 2009;8:34.
33. Tinto H, Guekoun L, Zongo I, Guiguemde RT, D'Alessandro U, Ouedraogo JB. Chloroquine-resistance molecular markers (*Pfprt* T76 and *Pfmdr-1* Y86) and amodiaquine resistance in Burkina Faso. *Trop Med Int Health*. 2008;13:238–240.
34. Gbotosho GO, Sowunmi A, Happi CT, Okuboyejo TM. Therapeutic efficacies of artemisinin-based combination therapies in Nigerian children with uncomplicated falciparum malaria during five years of adoption as first-line treatments. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84(6): 936–943.
35. Ndiaye JL, Randrianarivelojosia M, Sagara I, et al. Randomized, multicentre assessment of the efficacy and safety of ASAQ – a fixed-dose artesunate-amodiaquine combination therapy in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Malaria J*. 2009;8:125.
36. Adjei GO, Kurtzhals JA, Rodrigues OP, et al. Amodiaquine-artesunate vs artemether-lumefantrine for uncomplicated malaria in Ghanaian children: a randomized efficacy and safety trial with one year follow-up. *Malaria J*. 2008;7:127.
37. Owusu-Agyei S, Asante KP, Owusu R, et al. An open label, randomised trial of artesunate + amodiaquine, artesunate + chlorproguanil-dapsone and artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated malaria. *PLoS One*. 2008;3:e2530.
38. Kobbe R, Klein P, Adjei S, et al. A randomized trial on effectiveness of artemether-lumefantrine versus artesunate plus amodiaquine for unsupervised treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Ghanaian children. *Malaria J*. 2008;7:261.
39. Koram KA, Abuaku B, Duah N, Quashie N. Comparative efficacy of antimalarial drugs including ACTs in the treatment of uncomplicated malaria among children under 5 years in Ghana. *Acta Trop*. 2005;95:194–203.
40. Kabanyanyi AM, Mwita A, Sumari D, Mandike R, Mugittu K, Abdulla S. Efficacy and safety of artemisinin-based antimalarial in the treatment of uncomplicated malaria in children in southern Tanzania. *Malaria J*. 2007;6:146.
41. Carrara VI, Zwang J, Ashley AA, et al. Changes in the treatment responses to artesunate-mefloquine on the northwestern border of Thailand during 13 years of continuous deployment. *PLoS One*. 2009;4:e4551.

42. Laufer MK, Djimdé AA, Plowe CV. Monitoring and deterring drug-resistant malaria in the era of combination therapy. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77:160–169.
43. Stepniewska K, Taylor WR, Mayxay M, et al. In vivo assessment of drug efficacy against *Plasmodium falciparum* malaria: duration of follow-up. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:4271–4280.
44. Bloland PB. *Drug Resistance in Malaria*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2001.
45. Krishna S, White NJ. Pharmacokinetics of quinine, chloroquine and amodiaquine. Clinical implications. *Clin Pharmacokinet.* 1996;30:263–299.
46. Badoe EV, Lamptey R, Goka BQ. Amodiaquine-artesunate vs artemether-lumefantrine for uncomplicated malaria in Ghanaian children: a randomized efficacy and safety trial with one year follow-up. *Malaria J.* 2008;7:127.

Open Access Journal of Clinical Trials

Publish your work in this journal

The Open Access Journal of Clinical Trials is an international, peer-reviewed, open access journal publishing original research, reports, editorials, reviews and commentaries on all aspects of clinical trial design, management, legal, ethical and regulatory issues, case record form design, data collection, quality assurance and data auditing

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/open-access-journal-of-clinical-trials-journal>

Dovepress

methodologies. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Résumé

Le traitement Préventif Intermittent (TPI) chez la femme enceinte avec la SP est devenue depuis quelques années une recommandation dans plusieurs pays d'endémie palustre. Mais le niveau de résistance de *P.falciparum* à la SP pourrait remettre en cause son efficacité et son effectivité en TPI chez la femme enceinte. Le but du présent travail était d'évaluer la prévalence de l'infection placentaire, du petit poids de naissance et de l'anémie par deux stratégies de TPI avec la SP (non contrôlé *versus* non contrôlé) à Anonkoua-kouté et Samo où la prévalence du *dhfr* simple mutant 108 était respectivement de 62% and 52,2% au moment des travaux. Au total 420 femmes enceintes ont été enrôlées (212 et 208 dans les groupes TPI contrôlé et non contrôlé) et suivies jusqu'à l'accouchement. Les données à l'accouchement étaient disponibles 378 participantes. L'analyse en ITT modifiée a montré que 15,5% et 11,9% de participantes ont donné naissance à des bébés de faible poids de naissance respectivement dans les groupes TPI non contrôlé et contrôlé ($p=0,31$). Les résultats étaient similaires en analyse PP. Les prévalences de l'infection palustre placentaire, de l'anémie modérée ($Hb < 11$ g/dL) et sévère ($Hb < 8$ g/dL) étaient similaires dans les deux groupes ($p > 0,05$).

Le TPI-sp demeure efficace chez les femmes semi-immunes malgré le niveau de résistance de *P.falciparum* à la SP. Les dérivés pourraient être une alternative intéressante en TPI. Pour cela nous évalué les associations ASAQ et AL dans un essai Clinique, ouvert, randomisé, contrôlé, de non infériorité, chez les enfants âgés de 6-59 mois. Le premier critère de jugement était le taux de guérison à J28 et a été défini comme la proportion de patients présentant un taux de guérison après correction PCR après 28 jours de suivi

Un total de 251 patients reçus dans les hôpitaux d'Ayamé et de Dabakala et présentant un paludisme confirmé à *P.falciparum* ont été randomisés pour recevoir ASAQ (128) et AL (123). Après correction PCR les taux de guérison étaient de 100% pour chaque combinaison et les deux schémas thérapeutiques ont été bien tolérés.

ASAQ et AL demeurent efficaces dans le traitement du paludisme simple à *P.falciparum* chez les enfants Ivoiriens de 6-59 mois après 5 ans d'adoption par le PNLP. Cependant cette efficacité nécessite une évaluation continue et régulière.

Mots clé : Paludisme TPI Femme enceinte Efficacité Effectivité résistance SP *P.falciparum*

Summary

In recent years, intermittent preventive treatment for pregnancy (IPTp) with sulfadoxine-pyrimethamine (SP) has become policy in much of sub-Saharan Africa. But resistance to SP has been spreading across sub-Saharan Africa and thus the effectiveness of IPTp-SP has been questioned.

The present study therefore sought to assess the incidence of placental malaria, low birth weight, and anemia of two IPTp-SP approaches (directly observed treatment scheme versus no directly observed treatment) in Anonkoua-Kouté and Samo, Côte d'Ivoire where the reported prevalence of *dhfr* single mutant 108 was 62% and 52.2%, respectively.

A total of 420 pregnant women were enrolled (212 and 208, respectively, in the controlled and uncontrolled groups). Delivery outcome was available for 378 women. In the modified ITT analysis, low birth weight infants were born from 15.5% of women of the uncontrolled IPTp group and from 11.9% of women in the controlled IPTp group ($P = 0.31$).

The PP analysis showed consistent results. The proportion of women with placental malaria infection, moderate anemia (hemoglobin, 11 g/dL), and severe anemia (hemoglobin, 8 g/dL) at delivery were similar between the two groups ($P = 0.05$). IPT-sp remains efficacious in semi-immune women in area where resistance of *P.falciparum* is high. Artesimisinins derivatives can be an alternative to SP in IPTp.

In an open-label, non inferiority, randomized, controlled clinical trial, children aged 6–59 months were randomized to receive ASAQ or AL. A total of 251 patients who were attending the Ayame and Dabakala hospitals and presenting with symptomatic acute uncomplicated falciparum malaria were randomized to receive ASAQ (128) and AL (123). On day 28, the per-protocol analysis showed effectiveness rates of 98.4% and 96.6% for ASAQ and AL, respectively. After adjustment by PCR for reinfection, these rates were 100% for each drug, and both regimens were well tolerated.

ASAQ and AL remain efficacious treatments of uncomplicated falciparum malaria in Ivorian children 5 years after adoption but regular monitoring is needed.

Keywords: Malaria IPTp-SP Efficacy Effectiveness Resistance *P.falciparum* SP