



Université de Strasbourg
FACULTÉ DE PHARMACIE

N° d'ordre :

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

-

**ÉVALUATION DE L'ÉVOLUTION DES RESISTANCES DE
PLASMODIUM FALCIPARUM AUX TRAITEMENTS ANTIPALUDIQUES
EN AFRIQUE SUBSAHARIENNE**

Présenté par TOURTITE Chaïmae

Soutenu le 23/10/2023 à 16h devant le jury constitué de

Monsieur le Professeur **Jean-Marc LESSINGER**, Président du jury

Madame le Docteur **Julie BRUNET**, Directrice de thèse

Monsieur le Professeur **Yves HANSMANN**, Membre du jury

Monsieur le Professeur **Didier MENARD**, Membre du jury

Approuvé par le Doyen et par le Président de l'Université de Strasbourg



Doyen

Esther KELLENBERGER

Directeurs adjoints

Julien GODET

Béatrice HEURTAULT

Emilie SICK

Directeur adjoint étudiant

Léo FERREIRA-MOURIAUX

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT

Professeurs :

Philippe	BOUCHER	Physiologie
Nathalie	BOULANGER	Parasitologie
Line	BOUREL	Chimie thérapeutique
Pascal	DIDIER	Biophotonique
Saïd	ENNAHAR	Chimie analytique
Valérie	GEOFFROY	Microbiologie
Philippe	GEORDEL	Bactériologie, Virologie
Jean-Pierre	GIES	Pharmacologie moléculaire
Béatrice	HEURTAULT	Pharmacie galénique
Esther	KELLENBERGER	Bio-informatique
Maxime	LEHMANN	Biologie cellulaire
Eric	MARCHIONI	Chimie analytique
Francis	MEGERLIN	Droit et économie pharm.
Yves	MELY	Physique et Biophysique
Jean-Yves	RABST	Droit Economie pharm.
Françoise	DONS	Toxicologie
Valérie	SCHINI-KERTH	Pharmacologie
Florence	TOTI	Pharmacologie
Thierry	VANDAMME	Biogalénique
Catherine	VOMTHRON	Pharmacognosie
Pascal	WEHRLE	Pharmacie galénique

Professeurs-praticiens hospitaliers :

Julien	GODET	Biostatistiques - science des données
Jean-Marc	LESSINGER	Biochimie
Bruno	MICHEL	Pharm. clinique santé publique
Pauline	SOULAS-SPRAUEL	Immunologie
Geneviève	UBEAUD-SÉQUIER	Pharmacocinétique

Enseignants contractuels

Alexandra	CHAMPERT	Pharmacie d'officine
Matthieu	FOHRER	Pharmacie d'officine
Philippe	GALAIS	Droit et économie pharm.
Philippe	NANDE	Ingénierie pharmaceutique
Caroline	WILLER - WEHRLE	Pharmacie d'officine

Maîtres de Conférences :

Nicolas	ANTON	Pharmacie biogalénique
Fareeha	BATOOL	Biochimie
Martine	BERGAENTZLÉ	Chimie analytique
Elisa	BOMBARDA	Biophysique
Auréli	BOURDERIQUX	Pharmacochimie
Emmanuel	BOUTANT	Virologie et Microbiologie
Véronique	BRUSAN	Physiologie et physiopath.
Anne	CASSET	Toxicologie
Thierry	CHATAIGNEAU	Pharmacologie
Manuela	CHIRER	Pharmacie biogalénique
Guillaume	CONZATTI	Pharmacie galénique
Marcella	DE GIORGI	Pharmacochimie
Serge	DUMONT	Biologie cellulaire
Disèle	HAAN-ARCHIROFF	Plantes médicinales
Célien	JACQUEMARD	Chémoinformatique
Julie	KARDENKO	Pharmacochimie
Sonia	LORDEL	Chimie analytique
Clarisse	MAECHLING	Chimie physique
Rachel	MATZ-WESTPHAL	Pharmacologie
Cherifa	MEHADJI	Chimie
Nathalie	NIEDERHOFFER	Pharmacologie
Sergio	ORTIZ AQUIÑE	Pharmacognosie
Sylvie	PERROTTEY	Parasitologie
Romain	PERTSCHI	Chimie en flux
Frédéric	PRZYBYLLA	Biostatistiques
Patrice	RASDAM	Microbiologie
Eléonore	REAL	Biochimie
Andreas	REISCH	Biophysique
Ludvine	RIFFAULT-VALDIS	Analyse du médicament
Carole	BONZANI	Toxicologie
Emilie	SICK	Pharmacologie
Yaouba	SOUAIBOU	Pharmacognosie
Maria-Vittoria	SPANEDDA	Chimie thérapeutique
Jérôme	TERRAND	Physiopathologie
Nassera	TOUNSI	Chimie physique
Auréli	URBAIN	Pharmacognosie
Bruno	VAN OVERLOOP	Physiologie
Maria	ZENIOU	Chimio génomique

Maîtres de conférences - praticiens hospitaliers

Julie	BRUNET	Parasitologie
Nelly	ÉTIENNE-SELLOUM	Pharmacologie-pharm. clinique

Assistant hospitalier universitaire

Damién	BEITA	Biochimie
--------	-------	-----------

SERMENT DE GALIEN

JE JURE,

en présence des Maîtres de la Faculté,
des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens
et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit
dans les préceptes de mon art et de
leur témoigner ma reconnaissance en
restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique,
ma profession avec conscience et de respecter non
seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles
de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne dévoiler à personne les secrets
qui m'auront été confiés et dont j'aurai eu
connaissance dans la pratique de mon art.

Si j'observe scrupuleusement ce serment,
que je sois moi-même honoré
et estimé de mes confrères
et de mes patients.

REMERCIEMENTS

Je voudrais exprimer mes sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de cette thèse et tiens tout particulièrement à remercier les membres du jury pour l'honneur qu'ils me font en évaluant ce travail.

Au Professeur Jean - Marc LESSINGER, en tant que président de jury,

Je vous remercie d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse, sur un sujet assez éloigné de la biochimie, mais qui, j'espère, saura vous intéresser. Merci également pour vos enseignements tout au long de cet internat.

Au Docteur Julie BRUNET en tant que directrice de thèse,

Un grand merci tout d'abord pour avoir accepté d'être ma directrice et de m'avoir proposé ce sujet. Merci encore pour ta disponibilité et de m'avoir accompagné dans ce travail jusqu'au dernier instant. Enfin merci pour ta gentillesse et tes enseignements. Mon passage en parasitologie a été un des plus beaux moments de mon internat et ta bienveillance ainsi que celle de toute l'équipe y a beaucoup participé. Tes quiz et mots fléchés y sont aussi sûrement pour quelque chose.

Au Professeur Yves HANSMANN,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail de thèse et d'avoir libéré du temps pour y participer. Votre expérience clinique apporte une dimension essentielle à ce travail.

Au Professeur Didier MENARD,

Un grand merci pour avoir contribué à la réalisation de cette thèse, en proposant ce sujet et en donnant de votre temps tout au long de sa mise en place. Ayant travaillé sur le paludisme et sur la recherche des marqueurs de résistances, vous serez le plus à même de pouvoir juger ce travail.

A toute l'équipe du PTM, techniciens, biologistes et le reste des équipes,

Merci pour votre gentillesse et votre bienveillance.

A l'équipe de parasitologie-mycologie,

Merci aux filles de biologie moléculaire, Rachel, Morane, Sylvie et Marine, sans qui tout cela n'aurait pas été possible, ainsi qu'à Lydia, qui a porté une grosse partie de la technique sur ces épaules.

Merci à l'équipe de coprologie (#cacalogie pour les intimes), qui compte des techniciens incroyables. Mylène, tu auras été, au-delà d'une très bonne collègue, une très grande amie et une super rencontre. Xavier, Claire et Maïté, encore merci pour tout.

Merci à toute l'équipe de l'EOH, chez qui j'ai passé trois mois intéressants et dans une ambiance incroyable, ainsi qu'aux magnifiques internes avec qui j'ai partagé ce stage et ma passion pour l'Asie et le Japon, Astrid, Nathan et Amine.

Aux internes rencontrés tout au long de cet internat (la liste risque d'être longue),

Merci à mes co-internes de toujours, Anne, Mathilde et Chloé, avec qui tout a commencé.

Merci à mes internes de cœurs, Inès et Marion, qui comptent parmi mes plus belles rencontres dans cette belle ville qu'est Strasbourg !

Merci à la team actuelle du PTM, sans qui ce stage n'aurait pas été aussi génial, Taha, Yannick, Julien, Vlad, Nicolas, Antoine, Samih, Alia et Élise. Je n'oublierai jamais tous ces moments de rire et de joie passés ensemble.

Merci à ceux avec qui j'ai partagé de très bons moments et qui auront permis de rendre cette année de thèse la plus agréable possible, Clément et Clara, Tomas, Wassim, Maëlle, Assilina, Clotilde.

A tous mes amis, d'ici et d'ailleurs,

Merci à toutes mes copines, qui m'ont soutenu et qui sont là depuis bien longtemps maintenant, Zeinab, Houda, Nadia, Sondos, Rachel, Naïma, Fatima et bien d'autres encore.

Merci à Laurent, mon meilleur ami, ainsi qu'à Yamane et Khadidja, avec qui cette aventure en pharmacie à commencer et sans qui toutes ces années d'études n'auraient pas été les mêmes.

Merci à mes amis de longue date, Annissa et Félix, les premiers après mon arrivée en France.

A ma famille, sans qui je ne serai pas là aujourd'hui,

Merci à mes cousines, Myriam, Bouchra, Mina et Siham, qui sont comme des sœurs pour moi.

Merci à mes cousins, Ibrahim, Ismail, sans qui la vie ne serait pas aussi drôle.

Merci à Ilyasse, Ayoub, Marwan et Iman, mes frères et sœur que j'aime de tout mon cœur. Merci pour votre présence, vos rires, votre soutien. Sachez que vous êtes une grande fierté pour moi !

Je terminerai par remercier mes chers parents, mama Aïcha et papa Ahmed, deux personnes incroyables sans qui rien de cela n'aurait été possible. Merci de m'avoir élevé, soutenu dans tous mes projets et de n'avoir jamais douté de moi. Je vous aime du plus profond du cœur.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	9
LISTE DES TABLEAUX.....	11
ABRÉVIATIONS	12
INTRODUCTION	13
Partie 1 : Le Paludisme et <i>Plasmodium</i>	14
1. Généralités	14
2. Epidémiologie	14
2.1. Dans le monde	14
2.2. En France	16
3. Vecteur	17
4. Cycle parasitaire de <i>Plasmodium sp.</i>	20
4.1. Schizogonie (phase de multiplication asexuée).....	20
4.2. Sporogonie (phase de multiplication sexuée).....	20
5. Symptomatologie	21
5.1. Accès palustre de primo-invasion à <i>P. falciparum</i>	21
5.2. Fièvre bilieuse hémoglobinurique	22
5.3. Accès pernicieux à <i>P. falciparum</i>	22
6. Diagnostic parasitologique.....	23
6.1. Diagnostic microscopique	24
6.2. Diagnostic direct par test de diagnostic rapide	26
6.3. Diagnostic direct par biologie moléculaire.....	27
6.4. Diagnostic indirect.....	28
Partie 2 : Traitements et Résistances.....	29
1. Traitements antipaludiques	29
1.1. Généralités	29
1.2. Antipaludiques existants.....	29

1.2.1.	Les quinoléines	29
1.2.2.	Les antifolates	32
1.2.3.	Les naphtaquinones.....	33
1.2.4.	L'artémisinine et ses dérivés.....	33
1.3.	Prise en charge thérapeutique	36
2.	Résistances aux antipaludiques.....	38
2.1.	Introduction.....	38
2.2.	Asie du Sud-Est : un foyer d'apparition des résistances aux antipaludiques	38
2.3.	Mise en évidence de la résistance.....	39
2.3.1.	Tests <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	40
2.3.2.	Marqueurs de résistances	41
2.4.	Résistance à la chloroquine et ces analogues structuraux	43
2.4.1.	Apparition de la résistance.....	43
2.4.2.	Les marqueurs identifiés	44
2.4.2.1.	Gène <i>Pfcr1</i>	44
2.4.2.2.	Gène <i>Pfmdr1</i>	45
2.4.2.3.	Gènes <i>Pfpm2/3</i>	46
2.4.2.4.	Problématique de la « tolérance à la luméfantrine »	47
2.4.2.5.	Gène <i>Pfnhe</i> associé à la résistance à la quinine.....	47
2.4.2.6.	Récapitulatifs des résistances aux quinoléines.....	48
2.4.3.	Evolution en Afrique.....	48
2.4.3.1.	<i>Pfcr1</i>	48
2.4.3.2.	<i>Pfmdr1</i>	49
2.4.3.3.	<i>Pfpm2/3</i>	50
2.4.4.	Résistance à l'atovaquone.....	50
2.4.5.	Résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine.....	51
2.4.5.1.	Apparition de la résistance	51

2.4.5.2.	Les marqueurs associés	51
2.4.5.3.	Haplotypes identifiés	52
2.4.5.4.	Evolution en Afrique	53
2.4.6.	Résistance aux artémisinines et ses dérivés	55
2.4.6.1.	Apparition de la résistance	55
2.4.6.2.	Test de survie au stade annulaire.....	56
2.4.6.3.	Mécanisme de résistance : mutation du gène <i>Pfkelch13</i>	56
2.4.6.3.1.	Structure et mécanisme d'action.....	56
2.4.6.3.2.	Localisations et impacts des mutations.....	58
2.4.6.4.	Les marqueurs de résistance identifiés	60
2.4.6.5.	Situation en Asie du Sud-Est.....	61
2.4.6.6.	Situation en Afrique	62
2.4.6.6.1.	Afrique de l'Est.....	63
2.4.6.6.2.	Afrique centrale	65
2.4.6.6.3.	Afrique de l'Ouest	66
2.4.6.6.4.	Récapitulatif de la situation en Afrique	66
2.4.7.	Paramètres impactant sur la propagation de la résistance.....	67
2.4.8.	Perspectives envisageables contre la propagation de la résistance	69
2.4.8.1.	Nouvelles approches thérapeutiques	69
2.4.8.2.	Antipaludiques de nouvelles générations	70
2.4.8.3.	Recherche de nouveaux marqueurs de résistance	71
2.4.8.4.	Nouvelles mesures de prévention.....	72
2.4.8.4.1.	Chimio prophylaxie	72
2.4.8.4.2.	Développement d'un vaccin	73
2.4.8.4.3.	Anticorps monoclonaux prophylactiques	73
2.4.8.5.	Conclusion.....	73

Partie 3 : Etude de l'évolution de la résistance aux antipaludiques aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg	75
1. Introduction.....	75
2. Matériel et Méthodes	75
2.1. Sélection des patients et recueil de données	75
2.2. Analyse des données statistiques	77
2.3. Méthodes.....	79
2.3.1. Techniques d'amplification des gènes de résistance : TSARA réduit	79
2.3.2. Séquençage.....	80
CONCLUSION.....	81
ANNEXE	82
BIBLIOGRAPHIE	83

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Prévalence de <i>P. falciparum</i> , en 2020, chez les enfants entre 2 et 10 ans (4).....	15
Figure 2 : Les 4 pays d'Afrique présentant le plus de cas de paludisme (9).....	16
Figure 3 : Schéma représentant un moustique <i>Anopheles</i> sp. (10).....	17
Figure 4 : Répartition géographique d' <i>Anopheles gambiae</i> sp. et d' <i>A. arabiensis</i> superposée aux précipitations annuelles (en mm) (13)	18
Figure 5 : Répartition géographique d' <i>A. stephensi</i> selon l'OMS (18).....	19
Figure 6 : Cycle parasitaire de <i>Plasmodium</i> sp. (20).....	21
Figure 7 : Critères de gravité du paludisme grave d'importation de l'adulte à <i>P. falciparum</i> (23).....	23
Figure 8 : Logigramme du diagnostic biologique du paludisme d'après le SPILF (2017) (23).....	24
Figure 9 : Goutte épaisse (en haut) et frottis sanguin (en bas) après coloration.....	24
Figure 10 : Trophozoïtes de <i>Plasmodium</i> sp. sur une goutte épaisse colorée au Giemsa.....	25
Figure 11 : Trophozoïtes de <i>P. falciparum</i> sur un frottis sanguin coloré au MGG et une goutte épaisse colorée au Giemsa.....	25
Figure 12 : Test de diagnostic direct positif pour <i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> et Pan- <i>Plasmodium</i> (27)....	26
Figure 13 : Cartographie mondiale de la délétion du gène <i>pfhrp 2/3</i> selon l'OMS (28).....	27
Figure 14 : Chaîne respiratoire mitochondriale (42).....	33
Figure 15 : Structure chimique de l'artémisinine et de ses dérivés synthétiques (46).....	34
Figure 16 : Chronologie de l'introduction de l'artémisinine et ses dérivés en tant que traitements antipaludiques (40).....	34
Figure 17 : ACT recommandées par l'OMS comme traitement de première intention du paludisme à <i>P. falciparum</i> non compliqué (49).....	35
Figure 18 : (A) Imagerie mettant en évidence le cytostome et son rôle dans l'absorption de l'hémoglobine. (B) Mécanisme d'action des dérivés de l'artémisinine (50).....	36
Figure 19 : Recommandations de prise en charge et de suivi devant un paludisme d'importation chez l'adulte (23).....	37
Figure 20 : Répartition de la résistance de <i>P. falciparum</i> à la chloroquine, à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'artémisinine en Afrique et en Asie du Sud-Est (19).....	39
Figure 21 : Test d'efficacité thérapeutique (TES) (54).....	40
Figure 22 : Evolution de la propagation mondiale de la résistance à la chloroquine depuis son apparition en 1957 jusqu'en 2006 (34)	43
Figure 23 : Origine et propagation des haplotypes mutants de <i>Pfprt</i> (43)	45

Figure 24 : Schémas représentant différents modes d'action et déterminants de la résistance des médicaments antipaludiques (49).....	48
Figure 25 : Mutations Pfdhfr associées à la résistance à la pyriméthamine (41).....	51
Figure 26 : Mutations Pfdhps associées à la résistance à la sulfadoxine couramment rapportées (41)	52
Figure 27 : Origine et répartition géographique des différents haplotypes mutants de Pfdhfr (43)	53
Figure 28 : Structure de la protéine PfKelch13 (51).....	56
Figure 29 : Structure et mécanisme d'action de la protéine PfKelch13 (50).....	57
Figure 30 : Implication de PfKelch13 dans l'absorption de l'hémoglobine et sa participation dans l'activité des artémisinines (50)	57
Figure 31 : Schéma illustrant le gène Pfkclch13 ainsi que la localisation des différentes mutations (19)	58
Figure 32 : Autres hypothèses de l'impact de la mutation de Pfkclch13 sur la résistance aux artémisinines (51).....	59
Figure 33 : Nombre de TES sur <i>P. falciparum</i> , incluant au moins 20 patients et les taux d'échecs rapportés en Afrique selon l'ACT employé entre 2015 et 2021 (3)	62
Figure 34 : Répartition des mutations Pfkclch13 ayant une prévalence supérieure à 5% en d'Afrique d'après l'OMS (2015-2020) (3)	64
Figure 35 : Découpage de l'Afrique par l'ONU (94) (à gauche) et celui de l'étude (à droite)	76
Figure 36 : Représentation graphique de la répartition des cas de paludisme à <i>P. falciparum</i> recueillis au HUS entre 2010 et 2022	77
Figure 37 : Chimio prophylaxies rapportées ainsi que leur observance	79
Figure 38 : Schéma résumé du déroulé de la manipulation, comprenant une technique d'amplification des gènes de résistance (TSARA) suivi d'une technique de séquençage du génome.....	79

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les antipaludiques, leurs cibles ainsi que les marqueurs de résistance associés (19,20,54)	42
Tableau 2 : Liste des mutants Pfkclch13 « validé » et « candidat ou associée » selon l’OMS (3,54)...	60
Tableau 3 : Récapitulatif des marqueurs de résistance retrouvés en Afrique subsaharienne	67
Tableau 4 : Présentation de lignées de Plasmodium falciparum circulant en Afrique (48)	68
Tableau 5 : Récapitulatif des données statistiques.....	78

ABRÉVIATIONS

ABC : ATP binding cassette

ACT : Artemisinin-based combination therapy

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMM : Administration massive de médicaments

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine Triphosphate

CNV : copy number variation

DHODH : Dihydroorotate dehydrogenase

DMSO : Diméthylsulfoxyde

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

HRP : Histidine Rich Protein

IC : Intervalle de confiance

LAMP : Loop-mediated isothermal amplification

LDH : Lactate deshydrogénase

OMS : Organisation mondiale de la santé

PI3K : Phosphatidylinositol-3-kinase

PI3P : Phosphatidylinositol-3-phosphate

PCR : Polymerase chain reaction

RSA : Ring-stage survival assay

SPILF : Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française

TACT : Triple artemisinin-based combination therapy

TDR : Test de diagnostic rapide

TES : Therapeutic efficacy study

TPI : Traitement Préventif Intermittent

INTRODUCTION

Le paludisme, maladie parasitaire transmise par les moustiques du genre Anophèles, demeure l'un des défis majeurs en matière de santé publique à l'échelle mondiale. Prévalent dans de nombreuses régions tropicales et subtropicales, il affecte des millions de personnes chaque année, engendrant un fardeau significatif sur les systèmes de santé et les communautés touchées.

Bien que des avancées significatives aient été accomplies dans la lutte contre le paludisme, les stratégies de traitement se heurtent depuis quelques années à un obstacle majeur : l'émergence de la résistance aux antipaludiques. Effectivement, celle-ci compromet l'efficacité des traitements et met en péril les progrès réalisés dans la lutte contre cette maladie.

Afin de mieux comprendre cette dynamique complexe, une étude approfondie de l'évolution de la résistance aux antipaludiques est cruciale. C'est pourquoi une étude visant à examiner les tendances, les facteurs et les mécanismes sous-jacents à l'émergence et à la propagation de la résistance aux traitements antipaludiques a été initiée aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. L'accent a été particulièrement mis sur la région de l'Afrique subsaharienne. Cette zone concentre la majorité des cas de paludisme importés à Strasbourg et de manière plus générale en France. De plus, c'est dans cette région que la morbidité et la mortalité liées au paludisme sont les plus élevées, et où l'émergence de nouvelles résistances suscite les plus vives inquiétudes.

La première partie de ce travail mettra en lumière les caractéristiques et l'impact du paludisme en tant que maladie, soulignant son étendue géographique et son fardeau sur les populations touchées. La seconde partie se focalisera sur les traitements existants et les défis posés par la résistance aux antipaludiques, mettant ainsi en évidence l'importance de développer des approches innovantes pour faire face à cette menace grandissante. Enfin, la troisième partie consistera en une ébauche de l'étude de l'évolution des résistances qui sera réalisée sur des patients hospitalisés aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg entre 2010 et 2022 et revenant d'Afrique subsaharienne, offrant ainsi une perspective locale et contextuelle sur cette problématique d'envergure mondiale. Les résultats détaillés de cette étude seront présentés lors d'un prochain mémoire dédié spécifiquement à cette thématique.

Partie 1 : Le Paludisme et *Plasmodium*

1. Généralités

Le paludisme, issu de la racine latine “paludis” signifiant « marais », est une maladie infectieuse tropicale et potentiellement mortelle. Il est causé par un parasite du genre *Plasmodium* et se transmet à l’homme par la piqûre d’un moustique, l’Anophèle femelle, infectée.

La véritable cause de cette maladie, remontant pourtant à l’Antiquité, ne sera établie qu’à partir du XIX^{ème} siècle par le médecin français Charles Louis Alphonse Laveran qui fut le premier à observer et à identifier le parasite dans le sang d’un patient (1). Quelques années plus tard, d’autres scientifiques (tel que Ronald Ross, un médecin britannique) contribueront à la compréhension de sa transmission vectorielle (2). Ce sont ces découvertes qui ont permis de poser les bases de la lutte antipaludique.

Il existe de nombreuses espèces, mais seules cinq d’entre elles sont principalement responsables du paludisme chez l’homme : *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*. La gravité de l’infection varie en fonction de l’espèce, *P. falciparum* étant l’espèce la plus dangereuse.

2. Epidémiologie

2.1. Dans le monde

Le paludisme est considéré aujourd’hui comme une des premières pandémies parasitaires mondiales. Selon l’Organisation Mondiale de la Santé, en 2021, près de la moitié de la population mondiale était exposée au risque de paludisme (3). En effet, on estimait à 247 millions le nombre de cas de paludisme. Le nombre de décès, quant à lui, s’élevait à 619 000 dans le monde. Le nombre de cas se concentre surtout au niveau du continent Africain où a été enregistré 95 % des cas ainsi que 96 % des décès dus à cette maladie. Les enfants de moins de 5 ans représentaient 80 % de l’ensemble des décès.

P. falciparum et *P. vivax* sont les espèces prédominantes dans le monde avec une incidence estimée à 207 millions et 8,5 millions de cas respectivement en 2016 (3). *P. falciparum* se situe plutôt dans les régions intertropicales, dans les Amériques, dans de nombreux endroits d’Asie et dans une grande partie de l’Afrique (Figure 1).

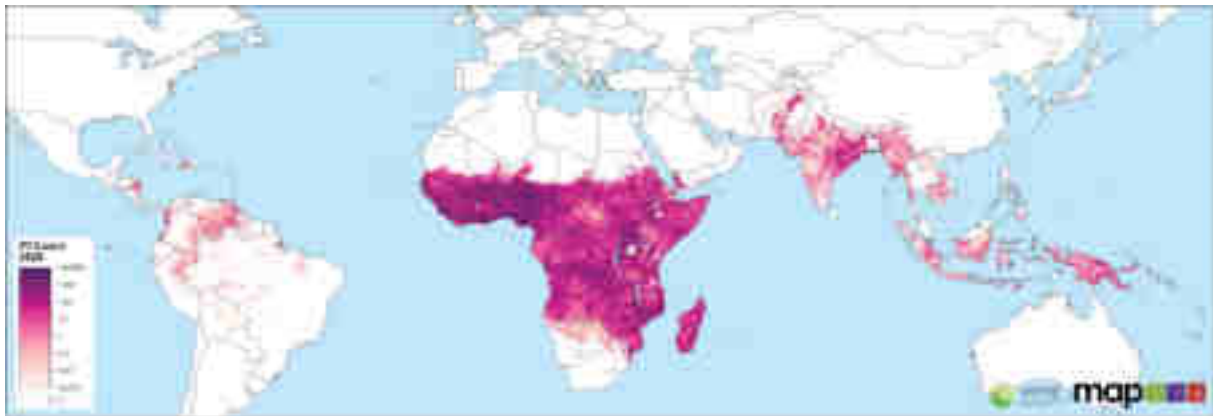


Figure 1 : Prévalence de *P. falciparum*, en 2020, chez les enfants entre 2 et 10 ans (4)

P. malariae et *P. ovale* ont aussi une distribution mondiale, mais avec une incidence plus faible, avec *P. ovale* qui est plutôt retrouvé en Afrique et en Asie du Sud-Est.

P. knowlesi est principalement zoonotique ; les hôtes simiens étant leurs hôtes naturels (5,6). Il est endémique dans toute l'Asie du Sud-Est et peut provoquer un paludisme grave. Son diagnostic fut très longtemps limité étant donné la difficulté à le distinguer des autres espèces par microscopie. En effet, sa forme sanguine annulaire est proche de celle de *P. falciparum* alors que les trophozoïtes et les schizontes ressemblent beaucoup à celle de *P. malariae*. C'est le développement des méthodes moléculaires, telles que la PCR, qui permet de faciliter le diagnostic d'espèce (5).

La distribution géographique de la maladie au sein de grandes régions est assez complexe. Il est possible de trouver des zones impaludées et non impaludées proches les unes des autres. Plusieurs facteurs peuvent jouer sur cette distribution, en impactant sur la prévalence et l'incidence de la maladie, tels que l'adéquation de l'environnement aux vecteurs locaux (l'altitude, le climat, la végétation et les mesures de contrôle mises en place), la pauvreté, les catastrophes naturelles ou encore les conflits armés (7).

L'OMS avait mis en place, en 2015, une stratégie mondiale de lutte contre le paludisme afin de diminuer l'incidence globale et le taux de mortalité de 40% d'ici 2020 et de 90% d'ici 2030. Cependant, cet objectif n'a pas été atteint, avec une diminution de 0% (8).

Quant à la pandémie de la Covid-19, elle a eu une répercussion importante sur les systèmes de santé de plusieurs pays. La situation s'est dégradée, avec par exemple une augmentation de la transmission dans les pays africains (29 pays avec 95% des cas). Il est donc aujourd'hui nécessaire de redoubler d'efforts afin de limiter le contrecoup de la Covid-19 sur la lutte antipaludique (9).

En Afrique, selon le BEH, 4 pays représenteraient près de la moitié des cas dans le monde. Il s'agirait du Nigéria (27 %), la République démocratique du Congo (12 %), l'Ouganda (5 %) et le Mozambique (4 %) (9) (Figure 2).



Figure 2 : Les 4 pays d'Afrique présentant le plus de cas de paludisme (9)

2.2. En France

En 2021, 2185 cas de paludisme ont été déclarés par le CNR paludisme, qui étaient pour la majorité des cas importés (9). 8 cas auraient été décrits comme étant autochtones, avec des cas aéroportuaires (probablement liés aux bagages) et d'autres possiblement nosocomiaux. Il y a eu une augmentation assez marquée du nombre de cas par rapport à 2020 (+117%), avec des taux proches de ceux observés avant la période de la Covid-19, sûrement due à la normalisation des voyages internationaux après la pandémie.

Les patients diagnostiqués en France ont été, pour la grande majorité, infectés en Afrique subsaharienne (99,3%). Ils étaient majoritairement d'origine africaine (90,6%) et *P. falciparum* (seul ou associé) était l'espèce principalement retrouvée (88,5%). Aucun accès à *P. knowlesi* n'a été diagnostiqué (9). De plus, la proportion des formes graves était élevée en 2021 (16,2%), avec 8 décès, correspondant à une létalité de 0,37% sur l'ensemble des cas et de 2,3% sur les formes graves.

3. Vecteur

Plasmodium est transmis à l'Homme principalement par piqûre d'un moustique hématophage culicidé du genre *Anopheles*. Seules les femelles sont hématophages (les mâles ne piquent pas et se nourrissent exclusivement de nectars de fleurs). Le repas sanguin leur assure un apport protéique supplémentaire nécessaire au développement des œufs (Figure 3) (10).

Après la ponte des œufs dans un point d'eau, pouvant aller de la simple flaque d'eau à des étendues plus grandes comme un lac ou une rizière, ceux-ci deviennent des larves, des nymphes et enfin des adultes. L'anophèle femelle pique principalement la nuit, pouvant commencer à partir du coucher du soleil jusqu'au petit matin (11).



Figure 3 : Schéma représentant un moustique *Anopheles sp.* (10)

Il existe environ 400 espèces et une quarantaine d'entre elles transmettent le parasite (11). Les espèces les plus répandues en Afrique sont *Anopheles gambiae sensu stricto*, *A. arabiensis* et *A. coluzzi*, faisant tous les trois partie du complexe *A. gambiae* (12). Reconnus comme étant les principaux vecteurs du paludisme en Afrique subsaharienne, ils ont été signalés dans plusieurs pays d'Afrique, principalement en milieu rural, humide, prospérant et proliférant dans des points d'eaux naturels et artificiels peu profonds (13,14). Selon l'espèce, ils vont être répartis différemment. Effectivement, *A. arabiensis* est plutôt retrouvé dans des zones sèches, notamment les savanes. A l'inverse, *A. gambiae*, qui a été identifié comme étant le vecteur le plus efficace dans la transmission de *P. falciparum* (15), est observé dans des zones très humide, de pluviométrie plus élevées (Figure 4) (13).

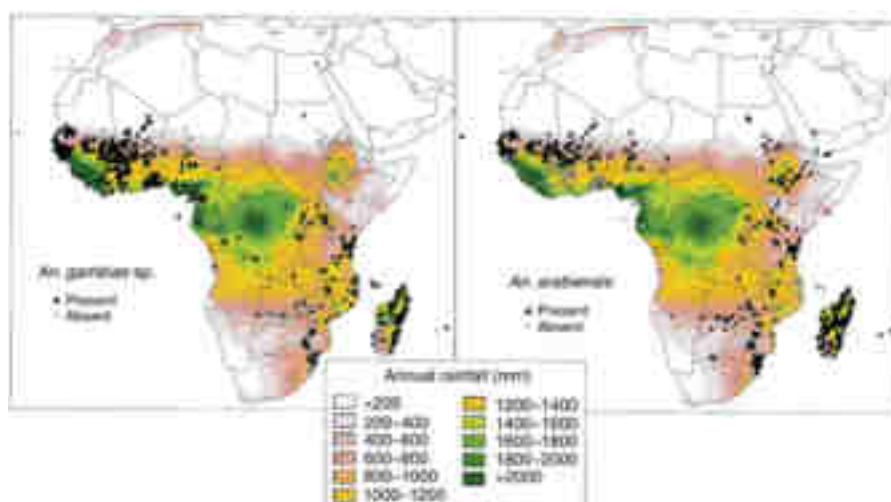


Figure 4 : Répartition géographique d'*Anopheles gambiae* sp. et d' *A. arabiensis* superposée aux précipitations annuelles (en mm) (13)

Les caractéristiques géographiques, telles que l'altitude, la température, l'humidité ou encore la pluviométrie, ont un impact sur la répartition des espèces vectrices et donc, par continuité, sur l'intensité de la transmission. Cela explique les différences de transmission d'une région à l'autre ainsi que les variations saisonnières pouvant être observées.

L'OMS a défini plusieurs catégories d'intensité de transmission (11) :

- Forte transmission : incidence parasitaire annuelle de plus de 450 cas pour 1000 habitants et une prévalence parasitaire à *P. falciparum* $\geq 35\%$
- Transmission modérée : incidence parasitaire annuelle entre 250 et 450 cas pour 1000 habitants et une prévalence parasitaire à *P. falciparum* comprise entre 10 et 35%
- Faible transmission : incidence parasitaire annuelle de 100 à 250 cas pour 1000 habitants avec une prévalence parasitaire à *P. falciparum* comprise entre 1 et 10 %
- Très faible transmission : incidence parasitaire annuelle inférieure à 100 cas pour 1000 habitants, et à une prévalence parasitaire à *P. falciparum* inférieure à 1 %

L'éradication de la maladie va dépendre de la compréhension de ces aspects d'intensité et de période de transmission, cela afin de permettre la mise en place d'une lutte antivectorielle adaptée et efficace.

Lorsque le rôle des moustiques dans la transmission de la maladie fut établi, des mesures furent prises afin de protéger les habitations par la pose de grillages-moustiquaires aux ouvertures, par l'utilisation de moustiquaires et par le drainage des zones d'eau propices à la reproduction des insectes. C'est dans les années 1940 que sont découverts les premiers insecticides, qui seront par la suite rapidement utilisés de

manière généralisée dans la stratégie de lutte, ciblant aussi bien les stades larvaires que les adultes. L'utilisation de moustiquaires imprégnées fait maintenant partie des recommandations en zone de transmission active du paludisme.

Malheureusement, des résistances aux insecticides ont fini par apparaître et sont aujourd'hui très répandues. Les vecteurs de près de 90% des pays endémiques auraient montré des résistances à une ou plusieurs classes d'insecticides, notamment aux pyréthrinoïdes, aux organophosphates, aux carbamates et aux organochlorés (3,11). Plusieurs approches sont étudiées actuellement afin de limiter ce phénomène et d'adapter au mieux la stratégie de lutte antivectorielle en fonction de la zone et de ces caractéristiques (moustiquaires imprégnées d'insecticides, traitements de surface résiduelle à l'intérieur d'un environnement à l'aide de produits chimiques endectocides (agissant à l'intérieur de l'organisme) et ectocides (agissant à l'extérieur de l'organisme)) (3).

Une autre espèce, dont la propagation semble importante et inquiétante ces dernières années, est celle d'*A. stephensi* (Figure 5) (3). Ce vecteur, originaire d'Asie du Sud et de certaines zones de la péninsule arabique, n'aurait cessé de se répandre jusqu'à être détecté en Afrique pour la première fois en 2012, dans la ville de Djibouti (16). Il serait aujourd'hui bien installé en Ethiopie (17).



Figure 5 : Répartition géographique d'*A. stephensi* selon l'OMS (18)

Contrairement aux autres vecteurs du paludisme en Afrique, plutôt localisés en milieu rural, *A. stephensi* est bien adapté aux infrastructures urbaines, représentant donc une menace importante (17). Le risque d'une épidémie de grande ampleur ne peut pas être écarté. De plus, ce moustique s'est avéré résistant à plusieurs insecticides utilisés par les établissements de santé. En 2022, une initiative consistant à améliorer la riposte nationale contre ce vecteur a été mise en place (3).

4. Cycle parasitaire de *Plasmodium sp.*

4.1. Schizogonie (phase de multiplication asexuée)

L'Anophèle femelle infectée va, afin de prendre son repas sanguin, piquer l'Homme et par la même libérer les sporozoïtes dans le sang. Le parasite va alors se multiplier de façon asexuée (schizogonie), suivant deux phases :

- La phase hépatique ou pré-érythrocytaire, qui est asymptomatique. Les sporozoïtes, pénétrant dans les hépatocytes, vont évoluer en schizontes hépatiques (corps bleu) qui vont eux-mêmes se rompre et libérer des mérozoïtes dans la circulation sanguine (19). Ce cycle, qui n'a lieu qu'une seule fois, a une durée de 7 à 20 jours (Figure 6).
- La phase érythrocytaire, qui est symptomatique. Les mérozoïtes, pénétrant dans les hématies, se transforment en trophozoïtes (anneau). S'en suit alors des « stades prolifératifs et morphologiquement distincts de trophozoïtes et de schizontes » (19). Lors de sa lyse, les schizontes libéreront de nouveau des mérozoïtes, initiant ainsi un nouveau cycle asexué dans le sang. La durée du cycle varie en fonction de l'espèce, durant 48h pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* (fièvre tierce) et durant 72h pour *P. malariae* (fièvre quatre) (6).

P. vivax et *P. ovale* présentent des formes quiescentes, les hypnozoïtes, pouvant persister des mois à des années dans le foie et pouvant libérer des mérozoïtes. Un paludisme plusieurs mois ou années après l'exposition pourrait orienter le diagnostic vers l'une de ces espèces (6).

4.2. Sporogonie (phase de multiplication sexuée)

Après un certain nombre de cycles, une partie des trophozoïtes se transforment en gamétocytes mâles et femelles (stades sexués), qui sont absorbés par le moustique lors de son repas sanguin (19). Commence alors la sporogonie, phase de multiplication sexuée. Les gamétocytes ingérés se transforment en gamètes mâles et femelles. Ceux-ci vont fusionner en un œuf libre, l'ookinète, qui va, après avoir quitté la lumière de l'estomac et s'être fixé sur la paroi externe, se transformer en oocyste. Les sporozoïtes vont alors se multiplier à l'intérieur de l'oocyste et vont pouvoir migrer vers les glandes salivaires et seront prêts à être inoculés lors d'un prochain repas sanguin.

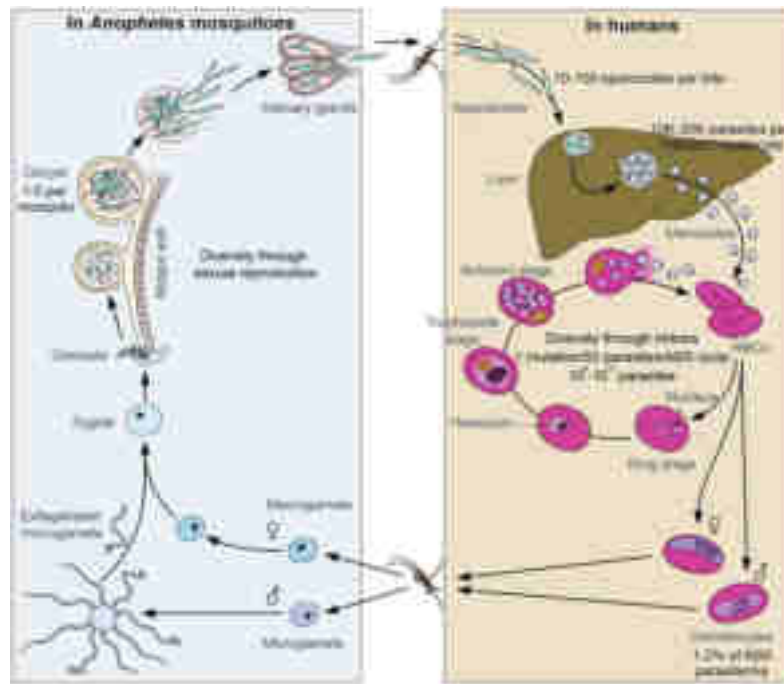


Figure 6 : Cycle parasitaire de *Plasmodium sp.* (20)

5. Symptomatologie

Le paludisme est une urgence diagnostique et thérapeutique au vu du risque d'évolution vers un accès palustre grave, appelé neuropaludisme ou encore accès perniciosus à *P. falciparum*. Le paludisme doit être recherché en premier lieu pour toutes personnes se présentant aux urgences avec une fièvre après un séjour en zone d'endémie.

5.1. Accès palustre de primo-invasion à *P. falciparum*

Il s'agit de la forme clinique la plus fréquente en France métropolitaine, touchant essentiellement les voyageurs en retour de zone d'endémie. Lors de la phase d'invasion, le patient présente une fièvre brutale, continue, accompagnée de céphalées, myalgies ou encore de troubles digestifs (douleurs abdominales, nausées, vomissements et parfois des diarrhées). Par la suite, le patient va présenter la triade classique de symptômes : des frissons, de la fièvre puis des sueurs.

5.2. Fièvre bilieuse hémoglobinurique

C'est un syndrome qui se produit lors d'une infection à *P. falciparum* associée à la prise d'antipaludiques appartenant à la famille des amino-alcools, tels que la quinine, l'halofantrine ou encore la méfloquine. En effet, il est généralement diagnostiqué chez des patients caucasiens ayant vécu en Afrique subsaharienne pendant plus de deux ans, qui ont été en contact fréquent avec le paludisme dans les zones endémiques et qui ont pris de manière répétée et irrégulière ces médicaments antipaludiques. Elle se caractérise par une hémolyse intravasculaire aiguë, avec comme symptômes de la fièvre (non systématique), des urines de couleur foncée (porto), un ictère (jaunissement de la peau et des yeux), des nausées et des vomissements, une diminution significative de la production d'urine (oligo-anurie) et une anémie sévère. Il est important de noter que ce syndrome contre-indique définitivement l'utilisation de cette classe d'antipaludiques.

5.3. Accès pernicieux à *P. falciparum*

Représentant 1 à 10% des cas, le neuropaludisme est une des complications majeures d'une infection à *P. falciparum* (21). Il peut survenir à la suite d'un accès palustre de primo-invasion non ou mal traité ou dès le début de l'infection, avec des symptômes assez évocateurs. Les manifestations cliniques sont exprimées par une fièvre accompagnée d'un dysfonctionnement cérébral, notamment un trouble de la conscience, des convulsions, pouvant évoluer vers un coma (mauvais pronostic). Cela peut être associé à des manifestations viscérales (avec des complications respiratoires, hépatiques, rénales, vasculaires), pouvant évoluer rapidement vers le décès du patient, en 24 à 48h chez les enfants, expliquant l'urgence diagnostique et thérapeutique de cette infection (6,21). Ces symptômes sont dus à une séquestration des hématies parasitées dans les capillaires cérébraux et s'expliquent par plusieurs mécanismes. Tout d'abord, les hématies vont développer des capacités cytoadhésives par l'acquisition de protéines, tel que la PfEMP1, qui vont pouvoir se lier à des récepteurs (ICAM-1, CD36) situés à la surface de l'endothélium (cytoadhérence), des plaquettes (clumping) ou d'autres globules rouges infectés (autoagglutination) ou non infectés (rosetting) et peut aboutir à des troubles circulatoires, une occlusion vasculaire et à une inflammation (22).

Les critères de gravité ont été définis par l'OMS en 2000 (23) (Figure 7). La présence d'un seul de ces critères suffit à poser le diagnostic d'accès palustre grave.

Prognostic	Critères cliniques et/ou biologiques	Fréquence
+++	Défaillance neurologique incluant : - obnubilation, confusion, somnolence, prostration - coma avec score de Glasgow < 11 - convulsion(s)	+++
+++	Défaillance respiratoire incluant : - si VM ou VNI : $PaO_2/FiO_2 < 300$ mmHg - si non ventilé $PaO_2 < 60$ mmHg et/ou $SpO_2 < 92\%$ en air ambiant et/ou $FR > 30$ /min - signes radiologiques : images interstitielles et/ou alvéolaires	+
+++	Défaillance cardiaque-circulatoire incluant : - PAS < 80 mmHg et/ou présence de signes périphériques d'insuffisance circulatoire - nécessité de drogues vasopresseives* et lactate > 2 mmol/l	++
++	Hémorragie : définition clinique	+
+	Ictère : clinique ou bilirubine totale > 80 μ mol/l	+++
+	Anémie profonde : hémoglobine < 7 g/dl, hématocrite < 20%	+
+	Hypoglycémie : glycémie < 2.2 mmol/l	+
+++	Acidose : bicarbonates plasmatiques < 15 mmol/l, ou acidémie avec pH < 7,35 (surveillance rapprochée dès que bicarbonates < 18 mmol/l)	++
+++	Hyperlactatémie : > 2 mmol/l (a fortiori > 5 mmol/l)	++
++	Hyperparasitémie : > 4% (voir texte long)	+++
++	Insuffisance rénale : créatininémie > 265 μ mol/l ou urée > 20 mmol/l	+++

VM : ventilation mécanique ; VNI : ventilation non invasive ; FR : fréquence respiratoire ; PAS : pression artérielle systolique.

Figure 7 : Critères de gravité du paludisme grave d'importation de l'adulte à *P. falciparum* (23)

6. Diagnostic parasitologique

Le diagnostic du paludisme est possible grâce à l'association de plusieurs techniques, telles que la microscopie, l'immuno-chromatographie, ou les techniques moléculaires. Le diagnostic de certitude est permis par la mise en évidence des formes érythrocytaires de *Plasmodium* sur un prélèvement de sang périphérique par microscopie. L'association d'une technique sensible (goutte épaisse, QBC ou technique de biologie moléculaire à réponse rapide) à un frottis mince (évaluation de la parasitémie et identification des espèces) est pour cela nécessaire (23) (Figure 8). Étant un diagnostic d'urgence, le résultat doit être obtenu dans un délai maximal de 2h après réception du prélèvement par le laboratoire.

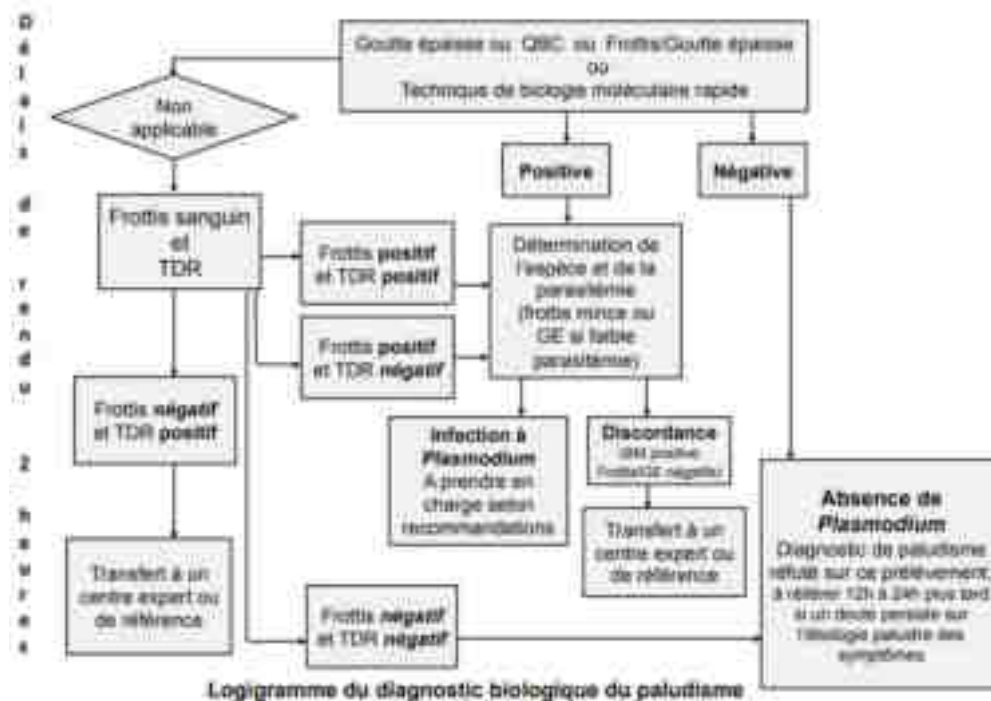


Figure 8 : Logigramme du diagnostic biologique du paludisme d'après le SPILF (2017) (23)

6.1. Diagnostic microscopique

L'examen microscopique est un élément essentiel dans le diagnostic du paludisme, reposant sur diverses techniques dont les plus couramment employées sont la goutte épaisse et le frottis mince (Figure 9).



Figure 9 : Goutte épaisse (en haut) et frottis sanguin (en bas) après coloration

La goutte épaisse, méthode de référence, consiste au dépôt d'une goutte de sang sur une lame. Cette goutte sera légèrement étalée puis colorée selon la méthode de Giemsa. Les globules rouges étant hémolysés, les diverses formes du parasite seront libérées et visibles sur l'ensemble de la lame (Figure 10), permettant ainsi une détection plus précise. Bien qu'excellente pour le diagnostic de genre, le diagnostic d'espèce est impossible avec cette méthode. La limite de détection est estimée à près de 50 parasites/ μ L dans des conditions optimales, équivalent à une parasitémie de 0,001 % (24).

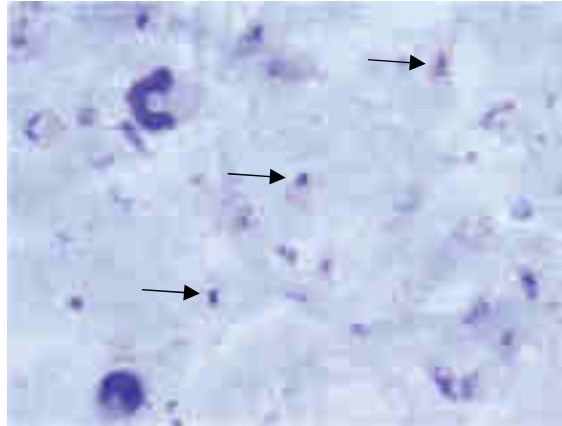


Figure 10 : Trophozoïtes de *Plasmodium sp.* sur une goutte épaisse colorée au Giemsa

Le frottis mince, examen de première intention du fait de sa simplicité, consiste en l'étalement de 3 μ L de sang sur la lame. Elle est ensuite colorée selon la méthode de May-Grünwald-Giemsa (MGG). Les parasites, se trouvant à l'intérieur des hématies, sont colorés en rouge (noyau) et bleu (cytoplasme) (Figure 11).

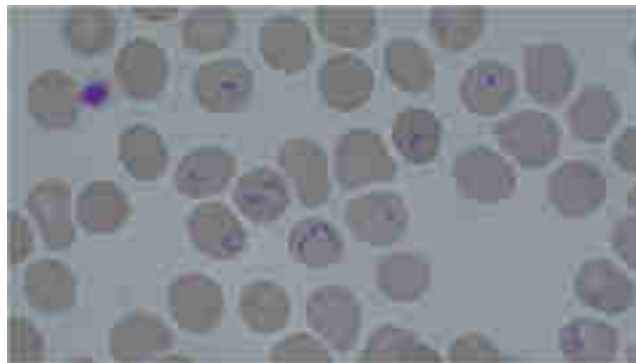


Figure 11 : Trophozoïtes de *P. falciparum* sur un frottis sanguin coloré au MGG et une goutte épaisse colorée au Giemsa

Cette technique permet le diagnostic d'espèce, qui est crucial pour le choix du traitement, ainsi que la quantification de la parasitémie, pouvant être utile pour évaluer la gravité de l'infection. La parasitémie est exprimée en pourcentage et représente la proportion de globules rouges infectés. Elle doit être néanmoins complétée d'une autre technique plus sensible. Cette méthode, ayant une sensibilité moins bonne que la goutte épaisse (1/10), peut se présenter négative lors d'une faible parasitémie (25).

Le QBC est basé sur une technique de centrifugation en tube capillaire, permettant de concentrer l'échantillon et d'en augmenter la sensibilité. Les parasites, se retrouvant après centrifugation au niveau de la couche leucocytaire, sont ensuite marqués de manière non spécifique avec un fluorochrome

(acridine orange). Sa sensibilité est équivalente à celle de la goutte épaisse et elle ne permet pas non plus le diagnostic d'espèce. Elle exige en revanche l'utilisation d'un équipement spécialisé, comprenant une centrifugeuse pour séparer les différentes couches cellulaires du sang ainsi qu'un microscope à fluorescence de qualité pour l'observation des parasites (25,26).

6.2. Diagnostic direct par test de diagnostic rapide

En parallèle de ces techniques microscopiques, un test de diagnostic rapide (TDR) par immunochromatographie sur bandelette est très souvent associé. Il a été développé pour simplifier et améliorer le diagnostic biologique du paludisme. Il consiste en la détection de protéines spécifiques de *Plasmodium* par chromatographie sur un support solide. Plusieurs kits différents existent, assez faciles d'utilisation et conditionnés individuellement.

Au sein des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS), le kit utilisé est le PALUTOP +4 OPTIMA[®] de Biosynex. Ce kit permet, en utilisant une méthode sandwich de capture (ELISA), la détection qualitative des antigènes des 4 espèces de *Plasmodium* dans le sang total ou sang veineux (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*), notamment la protéine PfHRP-2, spécifique de *P. falciparum* (bande Pf), un épitope de pLDH spécifique de *P. vivax* (bande Pv) et l'enzyme pLDH commune à toutes les espèces de *Plasmodium* (bande Pan) contribuant donc au diagnostic de genre et à l'orientation du diagnostic d'espèce (27) (Figure 12). La bande C correspond à la bande contrôle, permettant de vérifier la qualité du test. Les protéines PfHRP2 et PfHRP3 (protéines riches en histidine) sont synthétisées à partir des gènes *Pfhrp2/3* lors du stade sanguin de l'infection, mais aussi au stade sexuel précoce (1). Elles ne sont cependant pas sécrétées lors de la phase de gamétogonie, la bande correspondante pouvant alors ne pas apparaître. La limite de détection est assez basse pour *P. falciparum*, de 100 parasites/ μ L, lui conférant une bonne sensibilité (1). D'après la validation de méthode de Biosynex, le test a une sensibilité et une spécificité de 100% (27).

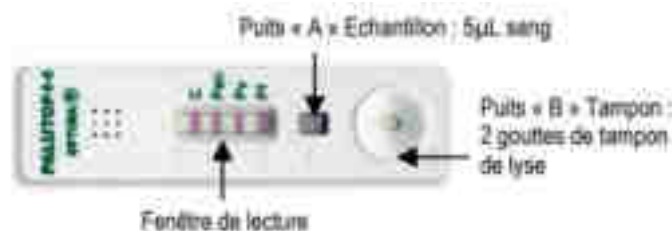


Figure 12 : Test de diagnostic direct positif pour *P. falciparum*, *P. vivax* et Pan-*Plasmodium* (27)

Certains parasites, incapables d'exprimer ces protéines PfHRP2/PfHRP3 suite à une délétion importante dans les gènes *Pfhrp2* et *Pfhrp3*, vont malheureusement être indétectables par TDR (3). Cela donne lieu à des résultats faussement négatifs, retardant la mise en place d'un traitement et contribuant à terme à la propagation de la maladie. Cela a été signalé pour la première fois en Amérique du Sud, avec une prévalence de certaines populations de *P. falciparum* allant jusqu'à plus de 50 % de délétions dans un ou les deux gènes (1). Elle s'est aujourd'hui répandue dans une grande partie des zones d'endémies de *P. falciparum* (Figure 13). Cette évolution souligne l'importance capitale de surveiller cette délétion pour garantir un diagnostic précis du paludisme. Des méthodes de diagnostic alternatives ne dépendant pas de PfHRP2 peuvent également être envisagées dans les zones de fortes prévalences.



Figure 13 : Cartographie mondiale de la délétion du gène *Pfhrp 2/3* selon l'OMS (28)

L'association du frottis mince et d'un TDR ne garantissant pas une sensibilité optimale, un contrôle entre 12 et 24 heures lors d'un résultat négatif ou douteux est impératif. Un contrôle par biologie moléculaire (PCR) peut être également envisagé (23).

6.3. Diagnostic direct par biologie moléculaire

Ces techniques, d'une sensibilité excellente et permettant le diagnostic d'espèce ont simplifié de manière importante le diagnostic de certains cas compliqués. Elles ont cependant un temps de réalisation assez long et un certain coût ne leur permettant pas, à l'heure actuelle, d'être envisagées en diagnostic de routine. L'une des alternatives à ces techniques, la LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification), en raison de sa grande sensibilité et de sa rapidité de réalisation (40 minutes), a pu être intégrée à l'algorithme de diagnostic primaire aux HUS. En effet, d'après De Koninck *et al.*, (24), elle a montré

une concordance de 100 % avec la PCR, la TDR et la microscopie, donnant une sensibilité et une spécificité de 100 % (IC à 95 % 95,1 à 100 % et 89,7 à 100 %, respectivement) et avec une limite de détection s'approchant des 0,5 parasites/ μ L pour *P. falciparum* et *P. vivax*, c'est-à-dire un seuil de détection 100 fois supérieur à la goutte épaisse. Son intérêt majeur est sa valeur prédictive négative (VPN), qui nous permet d'écarter un accès palustre lorsque le résultat est négatif (24). Toutefois, le résultat, portant uniquement sur le diagnostic de genre et étant purement qualitatif, elle ne pourra pas être utilisée seule.

6.4. Diagnostic indirect

La sérologie permet, par le dosage des anticorps dirigés contre *Plasmodium*, de mettre en évidence une exposition antérieure avec le parasite. Elle n'a cependant aucun intérêt dans le diagnostic de l'accès palustre.

Partie 2 : Traitements et Résistances

1. Traitements antipaludiques

1.1. Généralités

Les traitements antipaludiques jouent un rôle déterminant dans la lutte contre le paludisme. Ces traitements visent à traiter l'infection parasitaire, à réduire les symptômes et à prévenir les complications graves. L'utilisation d'un traitement spécifique dépend de divers facteurs tels que l'espèce de parasite impliquée, sa sensibilité aux médicaments et la gravité de l'infection. Il est essentiel de diagnostiquer correctement le paludisme avant d'administrer un traitement antipaludique, afin d'éviter les erreurs de médication et de minimiser l'émergence de la résistance aux médicaments.

1.2. Antipaludiques existants

Plusieurs classes sont utilisées dans le traitement du paludisme, notamment les sesquiterpènes, correspondant à l'artémisinine et à ses dérivés, les quinoléines, les antifolates et les naphtoquinones (19,29). Certains antibiotiques peuvent également être utilisés, comme la doxycycline, la tétracycline et la clindamycine. De nombreux mécanismes d'actions ont été décrits. Certains agissent en inhibant la cristallisation de l'hème, un produit toxique libéré lors de la dégradation de l'hémoglobine, en hémozoïne (substance inerte) dans la vacuole digestive. D'autres agissent en bloquant la fabrication des acides nucléiques ou encore en produisant de radicaux libres et en alkylant les protéines et lipides du parasite.

1.2.1. Les quinoléines

Les quinoléines comptent 3 classes chimiques différentes :

- Les 4-aminoquinoléines : chloroquine, pipéraquline, amodiaquine, pyronaridine
- Les 8- aminoquinoléines : primaquine
- Les amino-alcools : méfloquine, luméfantine, halofantine

Elles agissent toutes selon un mécanisme d'action similaire en inhibant une étape de la dégradation de l'hémoglobine se déroulant dans la vacuole digestive du parasite. Cette dégradation, permettant la production de nutriments (acides aminés) nécessaires à la croissance du parasite, s'accompagne de la production de la ferriprotoporphyrine IX, un composé dérivé de l'hème et toxique pour le parasite. Elle

est normalement neutralisée par cristallisation en hémozoïne, substance inerte apparaissant sous la forme de pigment noir au microscope. Ces antipaludiques, du fait de leur nature de bases faibles, se concentrent dans la vacuole digestive et en diminuent l'acidité. Cela a pour effet d'inhiber cette étape de détoxification de l'hème et d'entraîner une toxicité directe sur les stades sanguins, se traduisant par un effet schizonticide (19).

La quinine, le premier antipaludéen, est un alcaloïde isolé en 1820 à partir de l'écorce de quinquina d'Amérique du Sud (*Cinchona calisaya* et *C. pubescens*). Cette écorce était utilisée depuis des siècles par les jésuites au Pérou pour traiter la fièvre (30,31). C'est à la suite de problèmes d'approvisionnements de la quinine dans une grande partie du monde, lors de la Seconde Guerre Mondiale, induite par l'occupation japonaise des zones productrices de quinquina, que les efforts furent déployés pour rechercher des alternatives thérapeutiques. Elle a grandement participé à la prise en charge des accès palustre grave et est, à ce jour, proposée en deuxième intention dans le traitement du paludisme non compliqué.

La chloroquine est un dérivé synthétique de la quinine et synthétisée pour la première fois en 1934 par un chercheur allemand. Quelques années plus tard, nous découvrons qu'elle est plus efficace et mieux tolérée que la quinine, contribuant à une avancée majeure dans le traitement du paludisme (32). Elle était commercialisée sous le nom de Nivaquine® jusqu'en septembre 2022. Médicament efficace à action prolongée, sûr et rentable, elle était largement utilisée, surtout dans les années 1960 et 1970 (19,32). Cependant, l'apparition de résistance, à la fin des années 1950, a entraîné une recrudescence de la maladie, avec une augmentation de la morbidité et de la mortalité. En l'espace de 20 ans seulement, son efficacité s'est considérablement affaiblie, limitant fortement son utilisation (33). Pour lutter contre cela, d'autres traitements antipaludiques ont été déployés, parmi eux la sulfadoxine-pyriméthamine (des antifolates) ainsi que la méfloquine (34).

La méfloquine (Lariam®), une quinoléine méthanol faisant partie de la classe des amino-alcools, est un puissant schizonticide avec une demi-vie très longue (20 jours). Son mécanisme d'action exact est inconnu, mais certaines hypothèses évoqueraient la formation d'un complexe méfloquine-ferriprotoporphyrine IX qui serait toxique. C'est en 1984, en Thaïlande, que la méfloquine a été adoptée comme traitement de première ligne contre *P. falciparum*. Malheureusement, en six ans à peine, des résistances sont apparues malgré les règles strictes de son utilisation, s'étendant rapidement dans toute l'Asie du Sud-Est. En 1985, une combinaison de la méfloquine avec de la sulfadoxine-pyriméthamine avait été mise en place dans le but de retarder au maximum l'apparition de cette résistance. Néanmoins, elle fut très rapidement abandonnée, n'apportant aucun avantage par rapport à l'utilisation de la

méfloquine en monothérapie et les niveaux de résistances ne montrant pas de diminution significative. En thérapeutique, la méfloquine n'est plus recommandée seule aujourd'hui. Elle est associée avec un dérivé de l'artémisinine, l'artésunate. De plus, bien qu'elle soit encore utilisable seule en chimioprophylaxie dans certaines régions impaludées, la molécule est malheureusement bien connue pour ces effets indésirables d'ordre neuropsychiatrique, notamment la dépression, les hallucinations ou encore les délires paranoïaques (30,35).

La pipéraquline, une bis 4-aminoquinoléine, a été introduite dans les années 1960 en monothérapie. Elle est restée efficace pendant une dizaine d'années, les premiers rapports ayant mis en évidence une résistance étant parue dans les années 1970, répartie en partie en Asie du Sud-Est et en Chine. Il faudra attendre 2008 pour qu'elle soit prescrite en association avec autre dérivé de l'artémisinine, la dihydroartémisinine. Le mécanisme d'action n'a pas encore été totalement élucidé mais il semblerait similaire à celle des autres 4-aminoquinoléines. Son intérêt porte sur sa très longue demi-vie (13-28 jours) et son efficacité conservée malgré la présence d'une résistance à la chloroquine, faisant de lui un des principaux médicaments partenaires utilisés à ce jour (36).

La luméfántrine, un amino-alcool, a été introduite dans les années 2000 en association avec l'artéméther pour former un traitement combiné efficace et qui est largement utilisé de nos jours (36).

En tant que amino-8-quinoléines, la primaquine et la tafénoquine sont pour l'instant les seules molécules à avoir une activité sur les gamétocytes et sur les stades hépatiques tels que les hypnozoïtes, formes quiescentes de *P. ovale* et *P. vivax*. Elles sont prescrites lors d'un accès palustre à ces deux espèces, pour prévenir le risque de rechutes (reviviscences schizogoniques) après le traitement initial. La tafénoquine a pour avantage de pouvoir être administré en une seule prise, d'être bien tolérée et d'ainsi améliorer l'observance du traitement. Cependant, elle aurait montré une efficacité inférieure à celle de la primaquine (37). Leur mécanisme d'action est assez mal connu sur la phase hépatique. Sur les formes sanguines, elles agiraient en perturbant le transport d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale, générant ainsi des métabolites hautement réactifs qui vont entraîner des dommages oxydatifs. Enfin, l'ajout de primaquine en dose unique est fortement recommandé lors d'un accès palustre à *P. falciparum* pour son effet gamétocytocide.

La pyronaridine est une autre molécule dérivée de la quinoléine, récemment utilisée en combinaison avec l'artésunate (Pyramax®) qui a montré une bonne efficacité contre le paludisme à *P. falciparum* non compliqué de l'adulte et l'enfant de 5 kg dans toutes les zones d'endémie (38).

La méfloquine, la luméfántrine, la pipéraqúine, l'amodiaquine et la pyronaridine sont actuellement utilisées comme médicaments partenaires dans les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ACT) (19). Effectivement, bien que l'artémisinine et ses dérivés soient des traitements d'une grande efficacité, à action rapide et puissante, ils sont malheureusement très rapidement éliminés, au vu de leurs demi-vies très courtes (1-2h), nécessitant ainsi l'ajout d'un second antipaludique à plus longue durée d'action. Le médicament partenaire, grâce à sa longue demi-vie, va pouvoir agir sur les parasites résiduels sur une période de plusieurs semaines. Cette combinaison permet alors une élimination de la majorité des parasites en quelques jours, combinant plusieurs mécanismes d'actions et minimisant le risque d'apparition de nouvelles résistances aux traitements (39).

1.2.2. Les antifolates

Les antifolates agissent sur la voie des folates (vitamine B9), voie métabolique essentielle à la synthèse des acides nucléiques, tels que la pyrimidine, empêchant la réparation de l'ADN et la bonne production des protéines, indispensables à la survie du parasite (40). Ces médicaments vont inhiber la biosynthèse de l'acide folique en ciblant deux enzymes clé, la dihydroptéroate synthétase (DHPS) et la dihydrofolate réductase (DHFR), entraînant une perturbation de la croissance cellulaire et de la multiplication du parasite, ayant une division cellulaire rapide, aboutissant à sa mort.

Nous retrouvons dans cette catégorie d'antipaludiques la sulfadoxine, un sulfamide inhibant l'enzyme PfDHPS, ainsi que la pyriméthamine et le proguanil, inhibant quant à eux la PfDHFR (41). Les médicaments sont commercialisés sous forme d'association afin de permettre une action synergique sur la voie des folates et d'augmenter leurs efficacités, les deux associations existantes étant la sulfadoxine-pyriméthamine et l'atovaquone-proguanil.

L'association sulfadoxine-pyriméthamine fut une excellente alternative à la chloroquine, en particulier en Afrique, étant peu coûteuse, efficace et bien tolérée (40). L'efficacité de la pyriméthamine est découverte au début des années 1950, lors d'essais en monothérapie sur des enfants africains (42). À cette époque, lorsque la chloroquine était encore efficace, elle était principalement utilisée pour l'administration massive de médicaments ou comme chimioprophylaxie. C'est cette utilisation en monothérapie qui a favorisé l'apparition rapide de résistance. La sulfadoxine est testée quant à elle une décennie plus tard, se révélant efficace et à action prolongée. C'est en Thaïlande, en 1967, qu'est utilisée pour la première fois l'association sulfadoxine-pyriméthamine en première intention, montrant une réponse clinique importante lors d'un accès palustre à *P. falciparum*. Il faut attendre les années 1990 pour qu'elle soit adoptée en Afrique (40). Malheureusement, au vu de la résistance qui s'est rapidement

généralisée, il n'est plus recommandé de l'utiliser en monothérapie en tant que traitement thérapeutique. Il peut être prescrit en tant que médicament partenaire mais est surtout utilisé chez la femme enceinte à partir du deuxième trimestre et chez le nourrisson en tant que traitement préventif intermittent (TPI) (40,43).

1.2.3. Les naphtaquinones

Cette classe d'antipaludiques, dont fait partie l'atovaquone, cible spécifiquement le cytochrome b de *P. falciparum* (PfCytB), se situant au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale (dans le complexe III) (donneur d'électrons mitochondriaux) (Figure 14) (41).

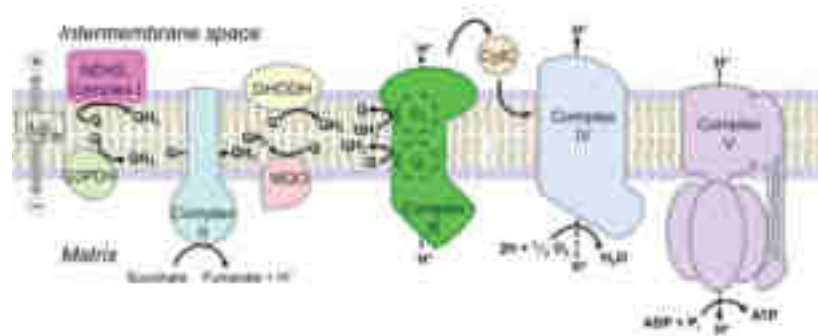


Figure 14 : Chaîne respiratoire mitochondriale (41)

L'atovaquone est utilisée en association avec le proguanil, dont le métabolite actif est le cycloguanil, sous le nom commercial Malarone®. Le proguanil a une action synergique avec l'atovaquone en dissipant le potentiel membranaire mitochondrial et permettant de limiter l'émergence de résistance. C'est l'une des chimioprophylaxies la plus utilisée par les voyageurs. Suite à l'émergence de résistances et au vu de son coût élevé, elle est maintenant très peu utilisée en zone d'endémie en tant que traitement thérapeutique (44).

1.2.4. L'artémisinine et ses dérivés

L'artémisinine est un sesquiterpène isolé d'*Artemisia annua*, une plante utilisée depuis très longtemps en médecine traditionnelle chinoise, également connue sous le nom d'armoise douce ou de Qinghao. Ce n'est que dans les années 1970 que sont découverts et isolés l'artémisinine et ses dérivés, comprenant l'artésunate, l'artéméter ainsi que la dihydroartémisinine qui correspond au métabolite actif (Figure 15) (30,45).

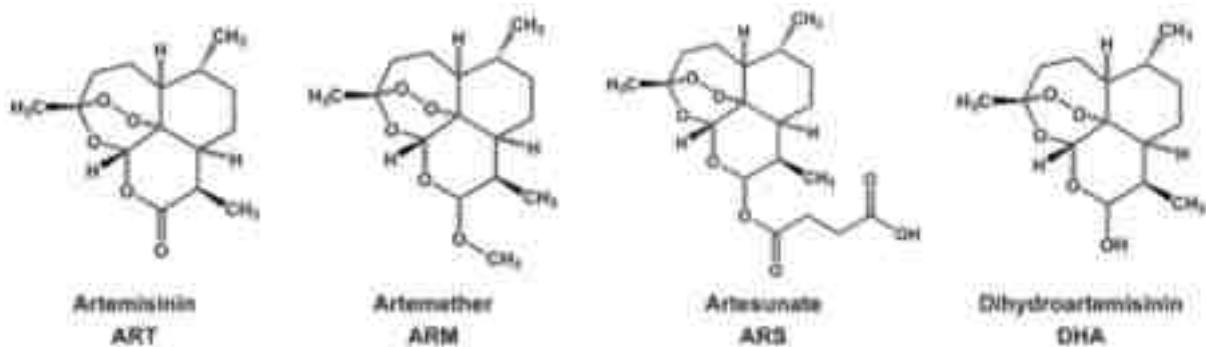


Figure 15 : Structure chimique de l'artémisinine et de ses dérivés synthétiques (45)

Leur utilisation en combinaison avec les médicaments partenaires en première intention dans le traitement du paludisme n'est recommandée qu'au début des années 2000 (Figure 16) (39).

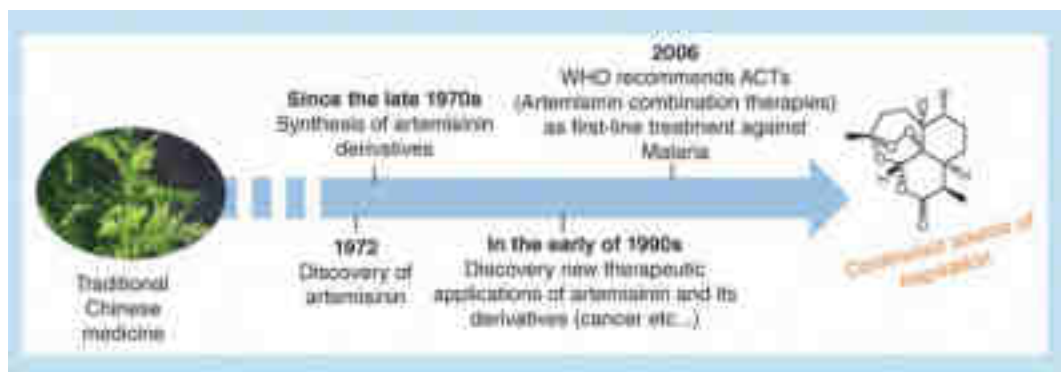


Figure 16 : Chronologie de l'introduction de l'artémisinine et ses dérivés en tant que traitements antipaludiques (39)

Leur découverte est intervenue à un moment crucial, devenant ainsi le deuxième traitement du paludisme d'origine naturelle après la quinine (46). Ils sont capables de faire baisser la parasitémie jusqu'à 10 000 fois en seulement 48h (47). Cette capacité rapide d'action est décisive dans le traitement du paludisme, notamment de formes sévères de la maladie où une intervention rapide est vitale pour la survie du patient. Comme mentionné précédemment, ce sont des antipaludiques très efficaces, mais d'une demi-vie relativement courte. C'est pourquoi il a été mis en place une association avec un médicament partenaire à élimination plus lente, en tant qu'ACT, dans le cadre d'un traitement sur 3 jours, ceci dans le but d'améliorer les taux de guérison et de ralentir le développement de la résistance (39).

À ce jour, plusieurs ACT sont disponibles. Les 6 recommandées par l'OMS dans le traitement des enfants et des adultes présentant un paludisme non compliqué à *P. falciparum* (à l'exception des femmes enceintes pendant le premier trimestre de la grossesse) sont l'artéméter + luméfántrine (Riamet®), l'artésunate + amodiaquine, la dihydroartémisinine + pipéraqúine (Eurartésim®), l'artésunate + méfloquine, l'artésunate + sulfadoxine-pyriméthamine ainsi que l'artésunate + pyronaridine (Figure 17) (48).

ACT derivative	Partner drug	Abbreviation	World use	Regions where first-line
Artemether	Lumefantrine	AL	74%	AFRO, AMRO, SEARO, EMRO, WPRO
Artesunate	Amodiaquine	ASAQ	24%	AFRO
Dihydroartemisinin	Piperaquine	DHA-PPQ	1%	AFRO, SEARO, WPRO
Artesunate	Pyronaridine	AS-PND	0.1%	SEARO, WPRO
Artesunate	Mefloquine	AS-MQ	1%	AMRO, SEARO, WPRO

Artesunate-sulfadoxine-pyrimethamine (AS-SP) is also a recommended first-line ACT in EMRO and SEARO WHO regions. AFRO, African Region; AMRO, Region of the Americas; SEARO, South East Asia Region; EMRO, Eastern Mediterranean Region; WPRO, Western Pacific Region.

Figure 17 : ACT recommandées par l'OMS comme traitement de première intention du paludisme à *P. falciparum* non compliqué (48)

En Asie du Sud-Est, les combinaisons thérapeutiques prédominantes sont l'artésunate-méfloquine et la dihydroartémisinine-pipéraqúine, tandis qu'en Afrique, l'artéméter-luméfántrine et l'artésunate-amodiaquine sont les principales combinaisons utilisées, représentant environ 98 % des doses administrées dans le monde (48).

Pour permettre leur activité, la dégradation de l'hémoglobine est un processus capital. En effet, ces molécules ciblent spécifiquement les stades intraérythrocytaires de *Plasmodium*, durant lequel se produit la dégradation de l'hémoglobine. Le fer héminique libéré lors de cette dégradation permet le clivage de leur pont endoperoxyde, générant ainsi des radicaux libres. Ces radicaux libres peuvent ensuite réagir avec les protéines, les lipides, l'ADN et d'autres molécules présentes dans le parasite, contribuant ainsi à son élimination.

C'est par le biais du cytotome que s'opère l'absorption et le transport de l'hémoglobine vers l'intérieur du parasite. Il s'agit d'un genre de renflement de la membrane cellulaire agissant comme une bouche cellulaire. Des invaginations cytotomales, qui sont des enfoncements de la membrane cellulaire, transportent de l'hémoglobine et finissent par fusionner avec une vacuole digestive acide, où aura lieu la dégradation de l'hémoglobine (Figure 18) (49).

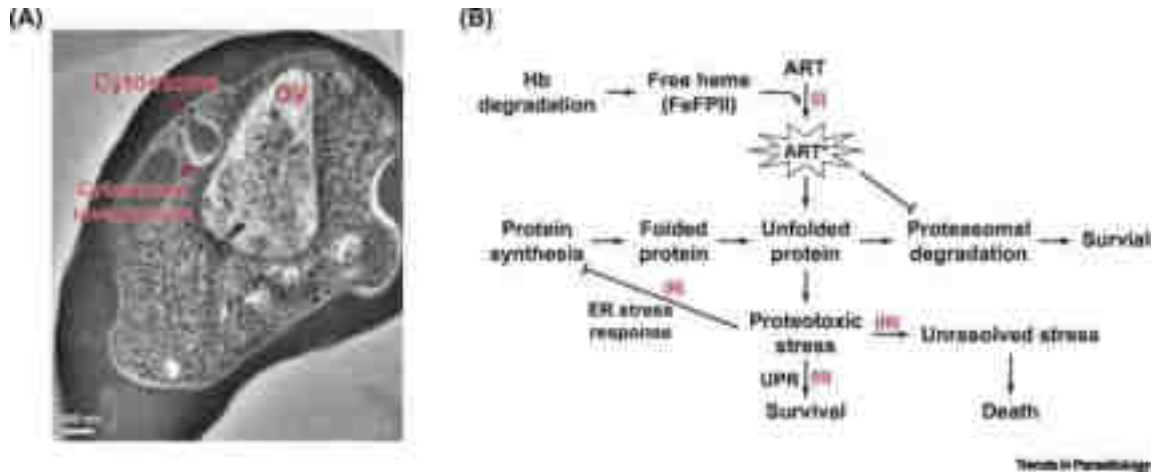


Figure 18 : (A) Imagerie mettant en évidence le cytotome et son rôle dans l’absorption de l’hémoglobine. (B) Mécanisme d’action des dérivés de l’artémisinine (49)

Tous ces dommages cellulaires aboutissent à une inhibition de la traduction protéique et à une accumulation de protéines polyubiquitinées (marquées pour la dégradation médiée par le protéasome). De plus, les artémisinines vont inhiber le protéasome ainsi que la formation de l’hémozoïne, entraînant une accumulation de l’hème, amplifiant le stress oxydatif (48).

Les artémisinines seraient également impliquées dans l’inhibition de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), qui est cruciale dans la voie de signalisation cellulaire PI3K/AKT/mTOR (50). Cette enzyme est fondamentale pour la synthèse de la phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P), qui s’avère essentielle à la croissance du parasite. En effet, il a été signalé une augmentation des niveaux de PI3P à mesure que les parasites évoluent, du stade d’anneau à celui de schizonte. Elle agirait en contribuant à la synthèse membranaire et à des phénomènes de fusion indispensables à cette croissance.

1.3. Prise en charge thérapeutique

Selon les recommandations de la SPILF, la prise en charge thérapeutique du patient est dépendante de sa clinique ainsi que du bilan biologique. Seront donc tout d’abord recherchés les signes de gravité, tels que des troubles de la conscience, une parasitémie élevée (>4%) ou encore un bilan biologique perturbé (anémie sévère, ...) (23) (Figure 19).

Si un de ces signes est retrouvé, un avis du réanimateur est alors nécessaire. Le patient est alors hospitalisé en urgence en réanimation et un traitement par artésunate en intraveineux (IV) (Malacef®)

est instauré pendant au moins 24h. En effet, l'artésunate a montré une meilleure efficacité que la quinine dans le traitement d'un accès grave. Il entraîne un effet parasiticide rapide et puissant et inhibe les phénomènes de séquestration (rosetting et cytoadhérence) en quelques heures (23). Un relais par voie orale est mis en place dès que possible avec une ACT pendant 3 jours.

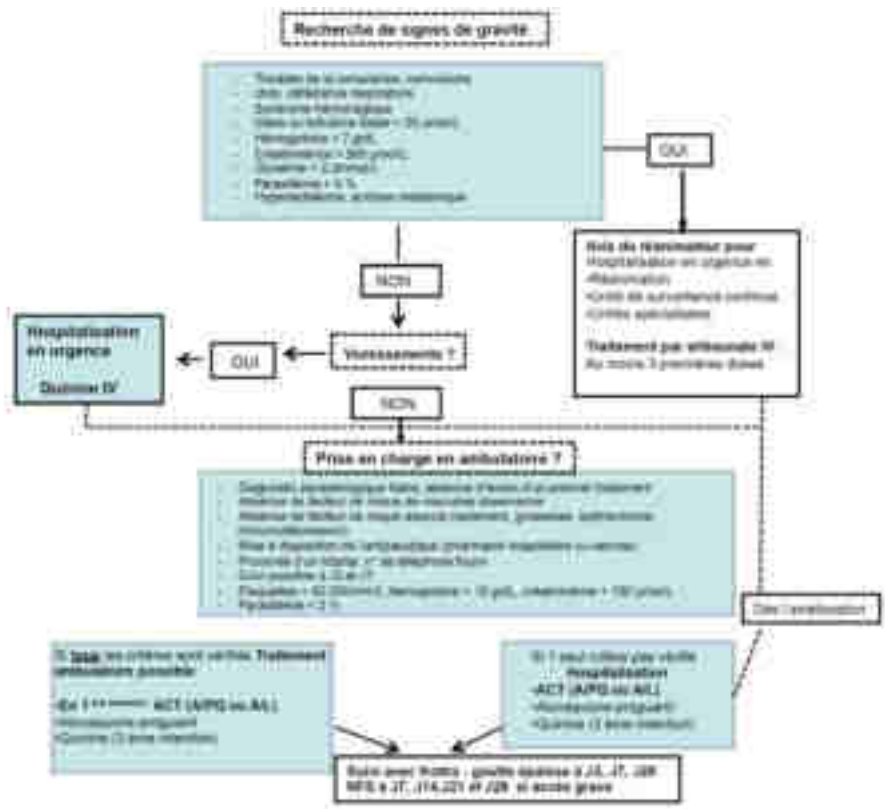


Figure 19 : Recommandations de prise en charge et de suivi devant un paludisme d'importation chez l'adulte (23)

Lors de vomissements, même si aucun des signes de gravité n'est retrouvé, une hospitalisation est nécessaire et un traitement par quinine IV est mis en place. Enfin, dans le cas où le patient ne présente pas de signes de gravité et lors du respect de certains critères (parasitémie <2%, absence de facteur de risque associé ou de mauvaise observance, ...), la prise en charge en ambulatoire est possible. Si un seul critère n'est pas vérifié, le patient est hospitalisé. Dans les 2 cas, un traitement par la dihydroartémisinine (aussi appelée arténimol)-pipéraquline ou l'artéméther-luméfantrine est instauré en première intention. Elle pourra être substituée par de l'atovaquone-proguanil en deuxième intention et par de la quinine en troisième intention (Figure 19) (23).

De plus, un suivi clinique et biologique est recommandé afin de vérifier l'efficacité du traitement. Ainsi sont réalisés un frottis sanguin et une goutte épaisse au 3^{ème} (J3), au 7^{ème} (J7) et au 28^{ème} jour (J28) (23). Des gamétocytes peuvent être retrouvés après traitement. Leurs présences ne justifient pas une seconde cure d'antipaludiques.

2. Résistances aux antipaludiques

2.1. Introduction

La compréhension des origines de la résistance et de ces mécanismes de propagation est capitale afin d'élaborer des stratégies visant à réduire son impact et d'alléger la charge mondiale de la maladie. Pour cela, nous nous intéresserons d'abord à l'Asie du Sud-Est, zone géographique très importante dans la résistance du paludisme. Nous verrons ensuite les tests mis en œuvre afin de mettre en évidence cette résistance pour enfin nous intéresser aux différents marqueurs existants en Afrique ainsi qu'à leur évolution.

2.2. Asie du Sud-Est : un foyer d'apparition des résistances aux antipaludiques

Le foyer d'apparition des résistances se situe en Asie du Sud-Est, dans la région du Grand-Mékong, et plus particulièrement à la frontière entre le Cambodge et la Thaïlande. Après l'émergence de résistances à la chloroquine, à la sulfadoxine, à la pyriméthamine, à la quinine et à la méfloquine, des parasites résistants aux dérivés de l'artémisinine ont finalement fait leur apparition. Les résistances à la chloroquine et à la sulfadoxine-pyriméthamine ont fini par se répandre largement en Afrique subsaharienne, compliquant la prise en charge des patients et obligeant une modification des stratégies thérapeutiques dans certaines régions (Figure 20) (19).



Figure 20 : Répartition de la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine, à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'artémisinine en Afrique et en Asie du Sud-Est (19)

La résistance aux antipaludiques a été fortement influencée par la manière dont ces traitements ont été utilisés et par les circonstances sociales et économiques qui entourent leur utilisation. Des facteurs tels que l'automédication, les doses inappropriées, les interruptions de traitements prématurées et les utilisations non-conformes aux directives médicales ont toutes contribué à l'émergence de la résistance (34). De ce fait, il a été notifié par l'OMS une utilisation inappropriée des antipaludiques ou de médicaments de mauvaise qualité, tels que des médicaments contrefaits ou de qualité inférieure (mauvaise concentration de principe actif, d'excipients ou dégradation à la suite d'une mauvaise conservation) (11). La pression médicamenteuse exercée par ces médicaments sous-dosés sur les souches de parasites favorise la sélection de mutants résistants par le biais d'une pression médicamenteuse (51).

En parallèle, les conditions de vie, l'accès limité aux soins de santé de qualité, la prévalence du paludisme, ainsi que la disponibilité et la qualité des médicaments dans certaines régions ont également joué un rôle capital dans ce phénomène (40). Cela souligne l'importance de stratégies globales qui vont au-delà de la simple mise à disposition de médicaments efficaces, en incluant des mesures éducatives, préventives et de surveillance afin de lutter au mieux contre la résistance aux antipaludiques.

2.3. Mise en évidence de la résistance

La surveillance de la résistance a été possible grâce à la réalisation de différents tests, tels que les tests *in vivo* et *in vitro*, ainsi que l'identification de marqueurs de résistance. Ce sont à l'heure actuelle des outils primordiaux pour comprendre l'évolution de la résistance aux médicaments antipaludiques (52).

2.3.1. Tests *in vivo* et *in vitro*

Les tests de résistance *in vivo* ou tests d'efficacité thérapeutique (TES), méthodes de référence standardisées par l'OMS, consistent en l'administration d'un traitement antipaludique à des patients infectés et à leur suivi biologique et parasitologique, sur une période de 28 ou 42 jours (selon le médicament partenaire administré) (Figure 21). Ces tests permettent de distinguer quatre types de réponse au traitement :

- L'échec thérapeutique précoce
- L'échec parasitologique tardif
- L'échec clinique tardif
- Une réponse clinique et parasitologique adéquate

Elles permettent donc le recueil d'informations précieuses sur l'efficacité clinique des antipaludiques utilisées dans une région donnée.

Cependant, ils vont être affectés par des facteurs tels que l'immunité de l'hôte, la qualité et la bonne quantité des médicaments administrés. Par exemple, pour la quinine, la résistance *in vivo* a été définie comme l'incapacité à éliminer le parasite après un traitement à la quinine de 7 jours, à des doses efficaces. Pour cela, il est nécessaire d'administrer la quinine toutes les 8 heures, une fréquence de prise qui peut être compliquée à suivre pour le patient. De plus, l'association d'effets indésirables survenant fréquemment à la seconde moitié du traitement, une période pendant laquelle le patient est souvent asymptomatique, à un goût plutôt amer du médicament, peut aboutir à de sérieux problèmes d'observances du traitement (31). Il est alors primordial de faire la distinction lors de l'interprétation des résultats entre un apport insuffisant du médicament et une véritable résistance.

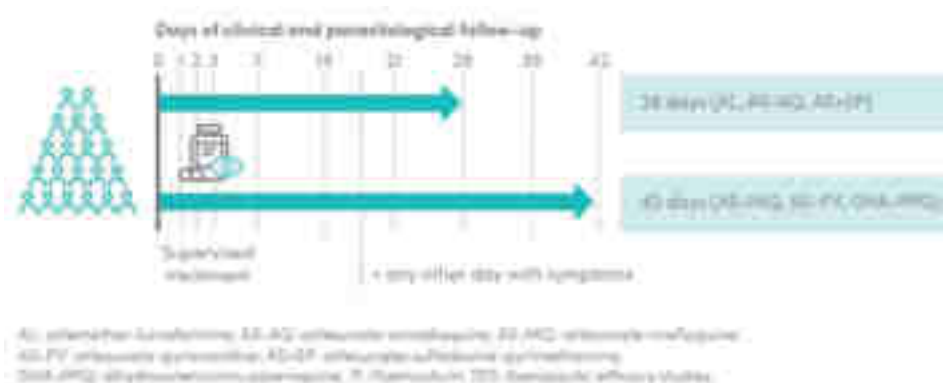


Figure 21 : Test d'efficacité thérapeutique (TES) (53)

Les tests de résistance *ex vivo/in vitro* impliquent l'exposition de *P. falciparum* à des concentrations définies de médicaments antipaludiques, dans des conditions de laboratoire contrôlées (52). Elle est évaluée par l'utilisation de la concentration inhibitrice à 50% (CI50), représentant la concentration d'antipaludique nécessaire pour inhiber la croissance de 50 % des parasites par rapport à témoin non traité. Plusieurs antipaludiques vont pouvoir être étudiés en même temps, et cela tout en s'affranchissant des facteurs liés à l'hôte. Bien que les données fournies soient précieuses, elles ne sont pas toujours fidèles à la complexité des interactions médicamenteuses *in vivo*. A ce jour, des recherches approfondies visent à établir une corrélation entre les résultats obtenus *in vitro* et les réponses *in vivo*, tout en étudiant les mécanismes sous-jacents (31).

2.3.2. Marqueurs de résistances

L'avancée de la biologie moléculaire a révolutionné la surveillance de la résistance aux médicaments. En effet, la détection de marqueurs moléculaires, correspondant à des mutations clé au sein des gènes cibles, a contribué à une meilleure analyse de l'évolution des souches résistantes, à estimer leur prévalence au sein des populations et à étudier leur propagation dans différentes régions (52). L'analyse est réalisable à partir d'un simple échantillon de sang, facilitant ainsi sa mise en œuvre lors d'enquêtes épidémiologiques ou encore dans des zones de conflit ou des camps de réfugiés. De ce fait, l'évaluation plus rapide d'un grand pool d'échantillons est possible, contrairement aux tests *in vivo* qui nécessitent un suivi plus contraignant des patients. Elle permet une détection précoce de l'émergence de la résistance, avant même qu'elle ne se manifeste cliniquement, ceci tout en évitant les biais liés à l'hôte et à l'environnement.

L'étude des marqueurs de résistance associés aux antipaludiques efficaces par le passé, par exemple la chloroquine, est toujours contributif dans l'amélioration de la surveillance moléculaire des antipaludiques actuellement utilisés, y compris les ACT (40). Ces marqueurs sont en effet impliqués dans la résistance à plusieurs antipaludiques encore prescrits de nos jours. Cette étude permet également de suivre l'évolution de la prévalence de la résistance dans certaines régions, après l'arrêt du traitement.

Tableau 1 : Les antipaludiques, leurs cibles ainsi que les marqueurs de résistance associés (19,20,53)

Classes chimiques	Noms communs	Stades parasitaires ciblés	Marqueurs de résistance <i>P. falciparum</i>
Sesquiterpènes	Artémisinine Artésunate Arthémether Dihydroartémisinine	Tous les stades du parasite	<i>Pfkelch13</i>
4-Aminoquinoléines	Chloroquine	Stades sanguins (trophozoïte et schizonte)	<i>Pfcr1, Pfmdr1</i>
	Amodiaquine	Stades sanguins (trophozoïte et schizonte)	<i>Pfcr1, Pfmdr1</i>
	Pipéraquline	Stades sanguins (anneau, trophozoïte et schizonte)	<i>Pfpm2/3</i> (amplifications), <i>Pfcr1</i>
	Pyronaridine	Stades sanguins (trophozoïte et schizonte)	<i>Pfcr1</i>
Amino-alcools	Quinine	Stades sanguins (trophozoïte et stades I à III des gamétocytes)	<i>Pfcr1, Pfmdr1</i>
	Méfloquine	Stades sanguins (trophozoïte et schizonte)	<i>Pfmdr1</i> (amplifications)
	Luméfantrine	Stades sanguins (trophozoïte et schizonte)	<i>Pfcr1, Pfmdr1</i>
	Halofantrine	Stades sanguins (trophozoïte et schizonte)	<i>Pfcr1, Pfmdr1</i>
8-Aminoquinoléine	Primaquine	Sang (gamétocyte) et foie (schizonte)	<i>Inconnu</i>
Antifolates	Pyriméthamine	Sang et schizonte hépatique et stade du moustique (oocystes)	<i>Pfdhfr</i>
	Sulfadoxine	Sang et schizonte hépatique	<i>Pfdhps</i>
	Proguanil	Stades sanguins (schizonte et gamétocyte) et schizonte hépatique	<i>Pfdhfr</i>
Naphthoquinone	Atovaquone	Stades sanguins (schizonte et gamétocyte) et schizonte hépatique	<i>Pfcytb</i>

Au cours des dernières années, des marqueurs de résistance à plusieurs traitements antipaludiques actuellement utilisés ont été identifiés et décrits (Tableau 1) (19). De ce fait, le suivi des sensibilités aux médicaments lors des infections cliniques devient impératif pour orienter la stratégie thérapeutique ainsi que les initiatives de distribution massive de médicaments visant l'éradication du paludisme. La mise à jour de marqueurs moléculaires de résistance a considérablement facilité la détection et la dissémination des parasites résistants aux médicaments.

La résistance aux médicaments va résulter de plusieurs mécanismes différents. Elle peut être due à un mécanisme catalytique direct, induit par l'amplification du gène codant pour l'enzyme cible, voir par le transporteur qui expulse le médicament hors du parasite. Elle peut également découler de processus qui visent à atténuer la toxicité induite par le médicament.

2.4. Résistance à la chloroquine et ces analogues structuraux

2.4.1. Apparition de la résistance

La résistance à la chloroquine est apparue à la fin des années 1950 en Asie du Sud-Est pour ensuite se répandre en Afrique de l'Est puis Centrale (à partir des années 1980), devenant finalement un problème sérieux dans de nombreux pays d'Afrique de l'Ouest dans les années 1990 (Figure 22) (34,42).

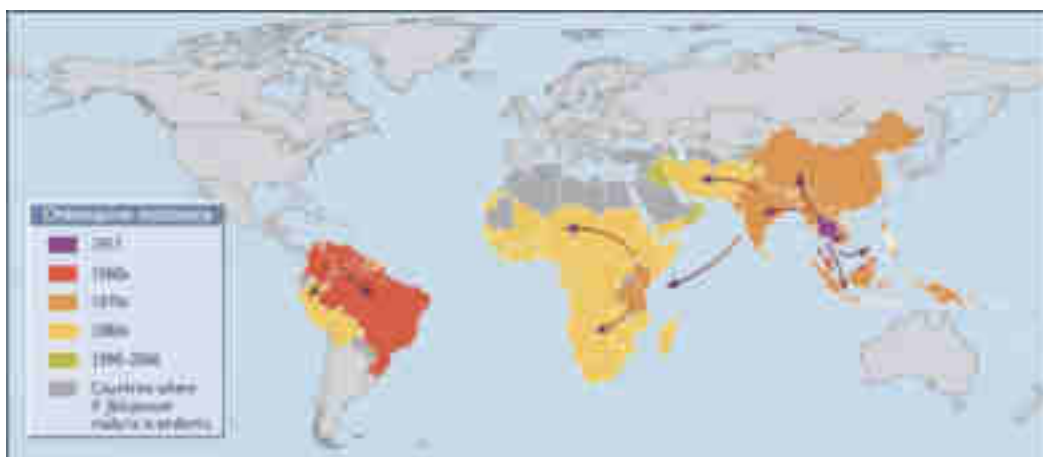


Figure 22 : Evolution de la propagation mondiale de la résistance à la chloroquine depuis son apparition en 1957 jusqu'en 2006 (34)

L'apparition de la résistance à la chloroquine dans la province de Pailin au Cambodge s'explique en grande partie par le traitement inapproprié des travailleurs migrants non immunisés venus travailler dans les mines d'extraction de pierres précieuses. Ces migrants, vivant dans des conditions très rudimentaires et dans une zone humide, étaient fortement exposés au vecteur et par conséquent, au parasite. Cette situation a conduit à plusieurs épidémies de paludisme. Un traitement a été mis en place, mais n'a malheureusement pas été administré à des doses curatives, favorisant la sélection de souches résistantes et contribuant ainsi à l'émergence de la résistance dans la région. De plus, les programmes d'administration massive de médicaments (AMM) à l'échelle mondiale ayant eu lieu dans les années 1950 et 1960 auraient également joué un rôle dans l'essor de la résistance. En effet, une corrélation

significative entre les régions où les AMM ont été déployées et les premières apparitions de la résistance à la chloroquine a été rapportée (34).

Concernant la quinine, une résistance est apparue relativement récemment en Asie du Sud-Est et en Afrique. Plusieurs études ont mis en avant une conservation de la sensibilité de la quinine entre 1970 et 2000, période pendant laquelle l'efficacité d'autres traitements tels que la chloroquine ou la méfloquine avait déjà considérablement diminué (31). En Asie du Sud-Est, la résistance a été mise en évidence de manière *in vitro* et *in vivo*, contrairement à l'Afrique, où elle n'est exprimée qu'*in vitro* pour l'instant. Si une évolution vers une résistance *in vivo* venait à être observée, cela risquerait de poser un problème dans la prise en charge du paludisme grave, la quinine étant actuellement toujours utilisée. Une résistance croisée *in vitro* entre la quinine et ses analogues structuraux, notamment la chloroquine, la luméfantine et la méfloquine a également été observée et s'expliquerait par des mécanismes de résistance similaires.

2.4.2. Les marqueurs identifiés

Deux gènes en particulier, codant pour des protéines de transport situées au niveau de la vacuole digestive, ont été identifiés comme étant responsables de cette résistance : *Pfcr*t (*P. falciparum* chloroquine resistance transporter) et *Pfmdr*1 (*P. falciparum* multidrug resistance 1). Ils vont avoir un impact sur la concentration intraparasitaire de plusieurs antipaludiques et donc sur leurs efficacités.

2.4.2.1. Gène *Pfcr*t

Le gène *Pfcr*t, qui se trouve sur le chromosome 7, joue un rôle central dans la résistance à la chloroquine (42). Il code pour la protéine PfCRT, une pompe à efflux localisée au sein de la vacuole digestive et est habituellement peu exprimée. Néanmoins, les polymorphismes au niveau du gène *Pfcr*t favorise l'expulsion de l'antipaludique de la vacuole digestive, diminuant ainsi sa concentration et par continuité son efficacité. La mutation non-synonyme la plus retrouvée est la K76T (Thréonine→Lysine) et est associée au développement de la résistance à la chloroquine en Afrique et à l'échelle mondiale. Cependant, cette résistance nécessiterait la présence d'au moins quatre autres mutations, telles que C72S, M74I, N75E, A220S, Q271E, N326S, I356T et R371I (48). Il est également responsable d'une résistance du parasite à l'amodiaquine et à la quinine, bien que l'implication de la mutation K76T dans la résistance de la quinine ait donné lieu à des résultats contradictoires (31). En effet, il a été noté, en Asie du Sud-Est, que l'activité *in vitro* de la quinine a tendance à être inversement liée à celle de la chloroquine, alors

que dans le reste du monde, leurs activités sont corrélées, montrant une certaine complexité de la résistance à la quinine.

Les polymorphismes des régions allant du codon 72 au codon 76 de *Pfcr*t conduisent à la formation de différents haplotypes mutants, qui sont d'excellents marqueurs du suivi de la résistance à la chloroquine. L'haplotype sauvage, CVMNK, va subir des mutations qui donne alors naissance à différents haplotypes mutants, dont les principaux sont CVIET, le plus fréquemment retrouvé en Afrique et qui entraîne une résistance significative, et SVMNT, qui prédomine en Amérique du Sud (54). CVIET trouve son origine en Asie du Sud-Est, pour se répandre par la suite en Afrique, tandis que SVMNT aurait tout d'abord émergé en Papouasie-Nouvelle-Guinée (42).

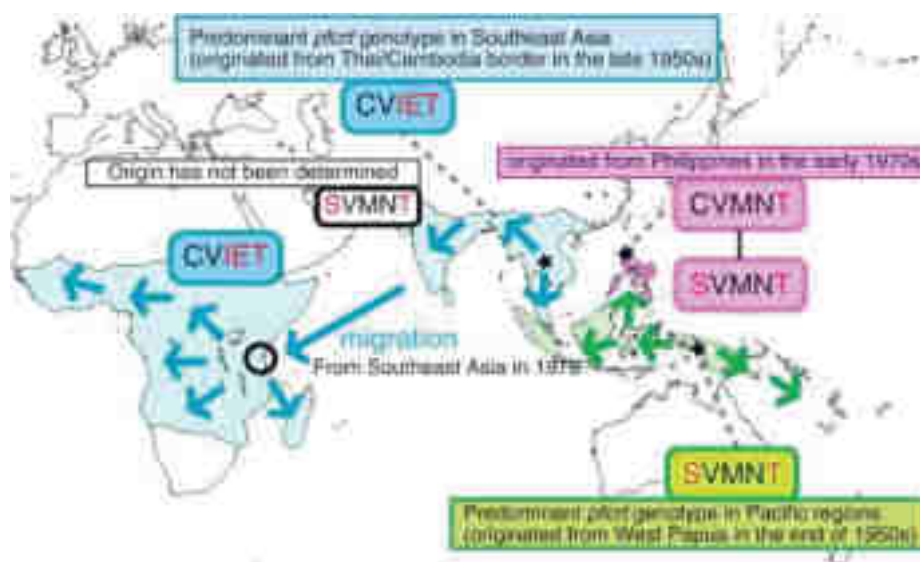


Figure 23 : Origine et propagation des haplotypes mutants de *Pfcr*t (42)

2.4.2.2. Gène *Pfmdr*1

Ce gène a été découvert lors des recherches sur les résistances à la chloroquine (55). Situé sur le chromosome 5, il code pour une glycoprotéine et plus exactement pour un transporteur de type ABC (ATP binding cassette) (52). Cette pompe va avoir un rôle détoxifiant en expulsant en particulier les antipaludiques hydrophobes de l'intérieur du parasite, réduisant ainsi leur efficacité. Il a donc un impact sur la sensibilité de nombreux antipaludiques.

Plusieurs mécanismes ont été décrits (19,42,52,55) :

- Des amplifications du gène, augmentant l'expression de la protéine et aboutissant à une réduction importante de la sensibilité de plusieurs amino-alcools, tels que la méfloquine, la quinine et de la luméfantrine (56)
- Des polymorphismes génétiques de différents codons, notamment N86Y (Asp→Tyr), Y184F, S1034C, N1042D et D1246Y, certaines mutations ayant un impact clinique moins importantes que d'autres (57).

Concernant la résistance à la quinine, ce sont plutôt les mutations N1042D, S1034C et D1246Y qui ont été retrouvées lors d'une résistance importante (31).

Il est important de noter que la présence de mutations de *Pfmdr1* seul ne conduit pas nécessairement à une réduction de l'efficacité de la chloroquine. En réalité, c'est l'association de *Pfmdr1*, essentiellement N86Y, avec la mutation *Pfcr1* K76T, retrouvée dans de nombreuses régions endémiques, qui va entraîner une augmentation du degré de résistance (42,58).

Les haplotypes mutants principaux vont être définis par la présence de mutations sur les codons N86Y, Y184F et D1246Y. L'haplotype sauvage de *Pfmdr1* correspond à l'haplotype NYD. D'autres haplotypes mutants existent et sont sélectionnés par certains ACT. Effectivement, l'artéméter-luméfantrine et l'artésunate-amodiaquine participe à la sélection de deux haplotypes, respectivement le mutant NFD et le mutant YYY (19,55).

2.4.2.3. Gènes *Pfpm2/3*

Situé sur le chromosome 14, ce gène code pour des protéases, les plasmepsines 2 et 3, et est impliqué dans la résistance à la pipéraquline. Ces protéases jouent un rôle décisif dans la dégradation de l'hémoglobine dans la vacuole digestive du parasite. Chez les parasites résistants à la pipéraquline *in vivo* et *in vitro*, il a été observé une augmentation du nombre de copies de ces gènes, pratiquement toujours associée à des mutations du gène *Pfcr1* ou alors à l'absence d'amplification du gène *Pfmdr1* (59). Ces amplifications favorisent le processus de dégradation de l'hémoglobine, entraînant une augmentation de la libération des acides aminés et aboutissant à la synthèse de nouvelles protéines. Ce mécanisme permet donc à terme de compenser l'inhibition du catabolisme de l'hémoglobine provoquée par le traitement et de favoriser la survie du parasite. L'utilisation répandue de la dihydroartémisinine-pipéraquline en Asie du Sud-Est exerce une pression médicamenteuse, favorisant ainsi la sélection des mutants *Pfpm2/3* (59).

Les mutations de *Pfcr*t semblent induire une résistance significative *in vitro*, même en l'absence de l'amplification de *Pfpm*2/3. Il est important de noter que les mutations retrouvées lors d'une résistance à la chloroquine (*Pfcr*t 74, 75, 76, 220, 271, 326, 356, 371) sont différentes de celles liées à la pipéraquline (*Pfcr*t 93, 97, 145, 218, 343, 350, 353) (60). En réalité, cela serait dû à un manque d'affinité des transporteurs impliqués dans la résistance à la chloroquine pour la pipéraquline et inversement. Cette relation inversée entre la chloroquine et la pipéraquline suggère la possibilité de réintroduire la chloroquine dans les zones où la résistance à la pipéraquline est élevée. Cela pourrait constituer une stratégie prometteuse, même si elle nécessite encore des études approfondies sur son efficacité et sa faisabilité dans les régions concernées.

2.4.2.4. Problématique de la « tolérance à la luméfantine »

La luméfantine, largement utilisée en association à l'artéméter, est liée à la sélection de parasites sauvages porteurs de *Pfcr*t 76K et de *Pfmdr*1 86N. Tout particulièrement, les associations *Pfmdr*1 86N/184F et 86N/1246D ont été rapportés plus fréquemment lors d'une réinfection chez des enfants venant d'Afrique traités par de l'artéméter-luméfantine (61). Ils sont pour l'instant qualifiés de parasites « tolérants à la luméfantine », car aucune émergence de résistance n'a été observée jusqu'à présent. Il sera toutefois important de les surveiller, afin de contrôler au mieux le passage vers une réelle résistance. Comme avec la pipéraquline, cette sélection entraînerait une augmentation de la sensibilité de la chloroquine, permettant d'envisager sa réintroduction dans les zones avec une résistance importante à la luméfantine (58).

2.4.2.5. Gène *Pfnhe* associé à la résistance à la quinine

Le transporteur échangeur Na/H, codé par le gène *Pfnhe* localisé sur le chromosome 13, serait impliqué dans la résistance à la quinine (31). Une hypothèse suggère qu'il pourrait jouer un rôle dans la régulation du pH cytosolique du parasite. La région la plus variable de ce gène est le microsatellite ms4760, qui est le site d'insertion ou de suppression de 5 blocs : DNND (bloc I), DNNND (bloc II), NHND (bloc III), DKNNKND (bloc IV), DDNNNDNDNDD (bloc VI). Il a été validé, lors de l'augmentation du nombre de répétitions de DNNND, une diminution significative de l'activité de la quinine. De plus, une recherche de l'impact de l'association du gène *Pfnhe* avec *Pfmdr*1 et *Pfcr*t sur la sensibilité de la quinine a été menée et elle aurait permis de mettre en évidence un meilleur marqueur de la résistance à la quinine *in vitro*, correspondant à l'association de la recherche d'une augmentation du nombre de copies de DNNND à un polymorphisme de *Pfmdr*1 (31). L'association avec *Pfcr*t K76T n'aurait, quant à elle, pas montré de différences significatives.

2.4.2.6. Récapitulatifs des résistances aux quinoléines

Selon Ward et al. (49), ces 2 schémas résument les différents mécanismes mis en place au sein du parasite ainsi que l'impact de la mutation de *Pfcrf* et de *Pfmdr1* (Figure 24).

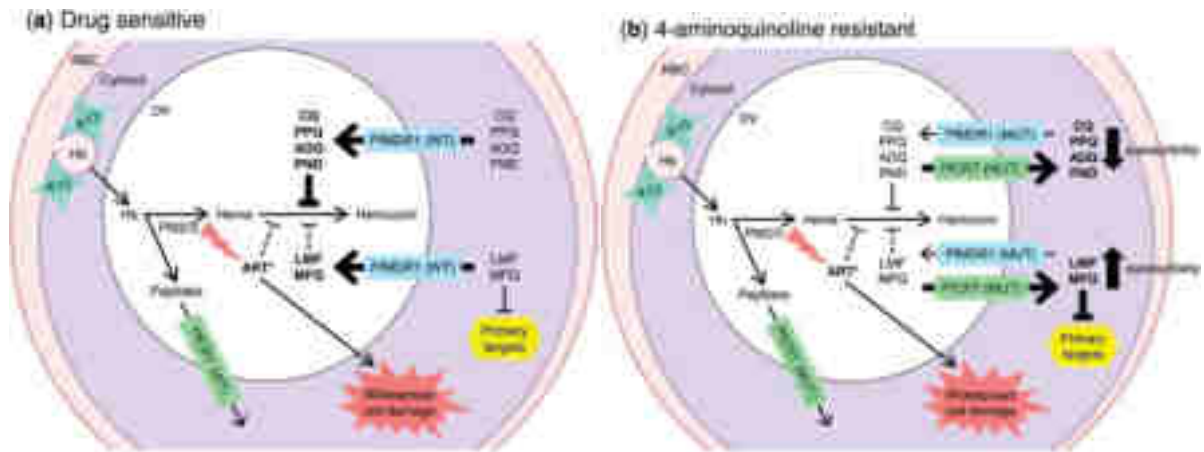


Figure 24 : Schémas représentant différents modes d'action et déterminants de la résistance des médicaments antipaludiques (48)

La protéine PfKelch13 participe à l'endocytose de l'hémoglobine dans le cytosol qui va ensuite passer dans la vacuole digestive, où elle est dégradée par les plasmepsines 2/3 (*Pfp2/3*), pour libérer des peptides et de l'hème. Les mutations dans les protéines PfMDR1 et de PfCRT vont impacter le transport des médicaments et entraîner respectivement, une réduction de l'accumulation de médicaments dans la vacuole digestive et une augmentation de la concentration dans le cytosol, aboutissant à une résistance élevée aux 4-aminoquinoléines et une sensibilité accrue à la luméfanantrine, la méfloquine ainsi qu'aux artémisinines, les cibles se situant plutôt dans le cytosol.

2.4.3. Evolution en Afrique

2.4.3.1. *Pfcrf*

Les parasites résistants à la chloroquine ont commencé à se propager en Afrique par la côte Est, au milieu des années 1970 et ont rapidement été retrouvés au Kenya, en Ouganda, ou encore au Malawi. C'est au milieu des années 1980 que les parasites résistants ont atteint l'Afrique centrale, touchant l'Angola par exemple, et l'Afrique de l'Ouest, se répandant alors dans de nombreux pays et devenant un problème sérieux dans le continent africain.

Plusieurs études, dont une réalisée entre 2012 et 2015 dans la province chinoise du Shandong par Xu *et al.*, analysant les polymorphismes de *Pfcr*t et *Pfmdr*1 de patients infectés par *P. falciparum* revenant d'Afrique, ont mis en évidence la présence majoritaire de l'haplotype CVIET, retrouvé également en Asie du Sud-Est, et l'absence totale du mutant SVMNT dans l'ensemble de ces échantillons (62). Ces résultats sont également observés dans une autre étude réalisée au Sud-Ouest de l'Ouganda (54). De plus, la prévalence de l'haplotype CVIET tournait autour des 20-30% dans les différentes régions d'Afrique, se situant plutôt autour des 80-90% il y a une dizaine d'années. Cela concorde avec plusieurs études montrant une diminution de la prévalence au fil des dernières années (54,63,64). Cette diminution s'expliquerait par l'arrêt de l'utilisation de la chloroquine, évitant ainsi la sélection de mutants et donc à terme une restauration de la sensibilité. Toutefois, le mutant SVMNT aurait été observé en Tanzanie et en Angola, ce qui pourrait être préoccupant, car il est associé à une résistance à l'amodiaquine (62). Il est à noter également que les niveaux de résistances à la chloroquine varient considérablement d'une région à l'autre, d'où la nécessité de poursuivre une évaluation des profils de résistance sur tout le territoire.

2.4.3.2. *Pfmdr*1

Xu *et al.* ont également rapporté que seules les mutations *Pfmdr*1 sur les codons 86, 184 et 1246 ont été retrouvées (62). Deux d'entre elles avaient été retrouvées à des fréquences assez considérables, N86Y dans un tiers des cas et Y184F dans presque deux tiers des cas, avec une prévalence importante de l'haplotype NFD. L'association des mutations *Pfcr*t K76T et *Pfmdr*1 N86Y a également été observée dans 8,9% des cas. La mutation D1246Y, retrouvée à faible fréquence dans l'étude, serait plutôt présente en Amérique du Sud et sa présence en Afrique serait due à des échanges entre les 2 continents. Plusieurs autres études ont retrouvé des chiffres similaires sur cette période-là (65).

La prévalence de ces polymorphismes en Afrique subsaharienne aurait plutôt tendance à diminuer de manière importante ces dernières années (63). Toutefois, suite à l'utilisation intensive de l'artéméthéroluméfantine au Ghana, une augmentation de l'haplotype NFD aurait été observée (66). Il en est de même dans le Grand Mékong, où l'utilisation de méfloquine en monothérapie pendant de nombreuses années a favorisé la sélection et la propagation des amplifications du gène *Pfmdr*1. Elles ont été retrouvées à une fréquence importante en Thaïlande, obligeant ainsi le changement du traitement de première intention par de la dihydroartémisinine-pipéraquline. Diverses études menées en Birmanie retrouvaient aussi une prévalence importante. Elles auraient toutefois été démenties par une enquête de grande envergure réalisée en 2016 (2%), permettant de conclure que la résistance à la méfloquine n'a pas donc

pas encore été sélectionnée dans ce pays (53). Tout cela suggère l'importance de surveiller l'utilisation des antipaludiques, en particulier ceux susceptibles de favoriser l'émergence de parasites mutants.

Le nombre de données disponibles sur la présence des amplifications de *Pfmdr1* en Afrique est assez faible. Toutefois, elles auraient été observées de manière assez rare pour l'instant, la méfloquine n'étant plus prescrite dans ce continent depuis quelque temps. Sa prévalence a toutefois montré une tendance à augmenter, surtout en Afrique de l'Est (63). Elles ont également été mises en évidence en Afrique de l'Ouest, à une très faible fréquence néanmoins (3%) et étaient absente en Afrique centrale (67). De plus, en Angola, seulement un dixième des patients présentait plusieurs copies du gène *Pfmdr1* (55).

Le suivi rapproché de ce marqueur est quand même important au vu de l'utilisation répandue de la luméfantine en tant que médicament partenaire, et cela, afin d'évaluer au mieux son implication dans la sélection de ces amplifications (67).

2.4.3.3. *Pfpm2/3*

Les amplifications de *Pfpm2/3* ont été signalées en Asie du Sud-Est, notamment à l'est de la Thaïlande, dans la province de Sisaket, où elle fut retrouvée, dans une étude réalisée entre 2015 à 2018, avec une prévalence importante (83,7%), impactant ainsi la prise en charge des patients et obligeant une modification du traitement.

Concernant le continent africain, c'est en Afrique centrale qu'est signalée la prévalence la plus importante, avec un pourcentage de 19,3%. Elle est suivie par l'Afrique de l'Ouest, qui retrouve 12,4% d'amplifications et finalement par l'Afrique de l'Est et Australe avec 8,3%. Dans ces 3 régions, la prévalence de l'amplification de *Pfpm2/3* était très variable d'un pays à l'autre, allant par exemple de 0% à 50% en Afrique centrale, avec le taux le plus élevé enregistré au Burundi en 2019 (53).

2.4.4. Résistance à l'atovaquone

La résistance à l'atovaquone est due à des mutations du gène *Pficytb*, entraînant des modifications dans l'activité catalytique du parasite. En effet, elle code pour le complexe bc1, qui joue un rôle dans le transport des électrons au niveau de la chaîne respiratoire et donc par continuité sur la synthèse de l'ATP. Elle serait induite par l'augmentation des dommages oxydatifs de l'ADN mitochondrial générés par l'action de l'atovaquone (44). En effet, aucune mutation n'a été observée sur des isolats sauvages, qui n'ont pas été soumis à une pression thérapeutique. De plus, l'action synergique avec le proguanil est

complètement dissipée. Une des mutations particulièrement retrouvées est la mutation *Pficytb* Y268S/C/N (19). En outre, une étude a établi une corrélation systématique entre cette mutation et l'inefficacité clinique de la Malarone® dès les premiers jours de sa mise sur le marché dans de nombreux pays (55).

2.4.5. Résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine

2.4.5.1. Apparition de la résistance

La résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine a, de manière inattendue et contrairement à la chloroquine, émergé très rapidement, dès l'année de sa prescription. Elle est décrite pour la première fois dans les années 1960 dans le Grand Mékong, mais seulement à partir des années 1990 en Afrique (40), s'expliquant par son introduction tardive en traitement de première intention dans le continent.

2.4.5.2. Les marqueurs associés

Les résistances à la pyriméthamine et à la sulfadoxine sont causées par des mutations dans les sites catalytiques des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* (19). Les plus fréquemment décrites dans le gène *Pfdhfr*, situé sur le chromosome 4, sont les mutations N51I (asparagine en isoleucine), C59R (cystéine en arginine), S108N (sérine en asparagine-/thréonine) et I164L (isoleucine en leucine) (Figure 25). D'autres mutations, telles que la A16V (alanine en valine), la C50R (cystéine en arginine) ou encore la N51I (asparagine en isoleucine), existent, mais sont retrouvées plus rarement. La mutation S108N, la mutation majoritaire, est responsable d'une diminution importante de l'affinité de liaison du parasite pour la pyriméthamine (40).

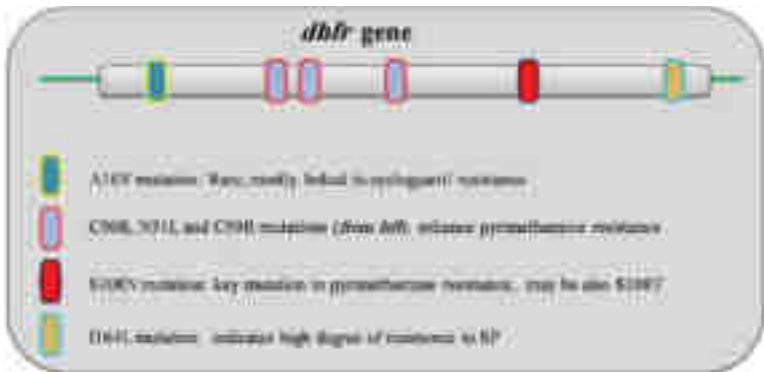


Figure 25 : Mutations *Pfdhfr* associées à la résistance à la pyriméthamine (40)

Quant au gène *Pfdhps*, situé sur le chromosome 8, des mutations dans les plusieurs codons, notamment I431V (isoleucine en valine), S436A (sérine en alanine), A437G (alanine en glycine), K540E (lysine en acide glutamique), A581G (alanine en glycine) et A613T (alanine en sérine/thréonine), ont été mises en évidence et pour lesquelles un lien de causalité avec une résistance à la sulfadoxine aurait été démontré (Figure 26) (40,43). Ce sont les mutations A437G et K540E qui sont les plus retrouvées, la résistance pouvant être renforcée par l'ajout d'autres mutations, telles que S436A, A581G et A613S.



Figure 26 : Mutations *Pfdhps* associées à la résistance à la sulfadoxine couramment rapportées (40)

L'analyse combinée de ces 2 gènes est très importante encore aujourd'hui. Cette combinaison est encore largement utilisée dans le cadre du traitement préventif intermittent (TPI) chez la femme enceinte ainsi qu'en tant que médicament partenaire dans les ACT, la propagation de la résistance limitant donc son utilisation.

2.4.5.3. Haplotypes identifiés

Le suivi de la propagation de la résistance dans le monde a été rendu possible par l'identification des différents haplotypes mutants de *Pfdhfr*, correspondant aux mutations au niveau des codons 50, 51, 59, 108 et 164. Parmi eux, nous retrouvons l'haplotype sauvage CNCSI, ainsi que les haplotypes mutants, classés par fréquence décroissante en Afrique, CIRNI, qui est largement prédominant, suivi des haplotypes CNRNI, C_ICNI, CNCNI. Il semble que l'haplotype CNRNI, apparu à la frontière thaïlandaise, ait accumulé plusieurs mutations pour évoluer vers des mutations triples et quadruples (42) (Figure 27).

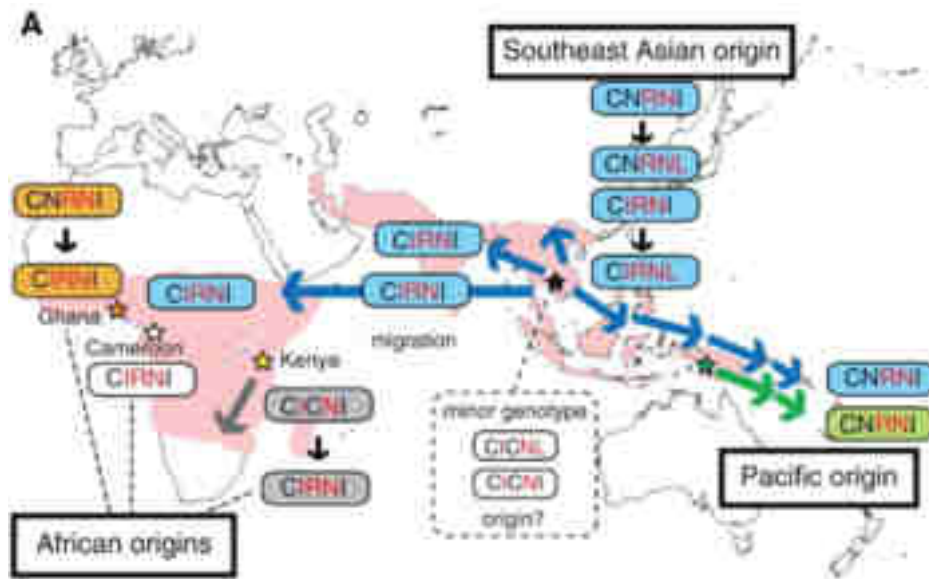


Figure 27 : Origine et répartition géographique des différents haplotypes mutants de *Pfdhfr* (42)

Concernant le gène *Pfdhps*, l'haplotype sauvage, correspondant aux codons 431, 436, 437, 540, 581 et 613, est ISAKAA. Il existe de nombreux haplotypes mutants, les plus fréquents étant ISAEAA, IAAKAA et ISGKAA.

2.4.5.4. Evolution en Afrique

Plusieurs études en Afrique ont étudié l'association entre les mutations génétiques et la résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine, tant *in vitro* qu'*in vivo* et ont établi une corrélation significative entre ces deux paramètres. Le triple mutant *Pfdhfr* N51I/C59R/S108N (CIRNI) prédomine actuellement dans de nombreux pays d'Afrique et est associé à la résistance partielle à la sulfadoxine-pyriméthamine (40,42,43,68–70). La mutation quintuple, associant le triple mutant *Pfdhfr* au double mutant *Pfdhps* A437G/K540E est associée à une résistance complète (70). A l'exception de la mutation K540E, les changements des recommandations thérapeutiques face à l'émergence de résistance n'ont pas permis de diminuer la prévalence des marqueurs tels que N51I, C59R, S108N. Au contraire, leur prévalence semble avoir augmenté jusqu'à atteindre un niveau saturé dans la population, indiquant ainsi une très forte prévalence dès 2005 (64).

La mutation *Pfdhfr* I164L a été signalée dans différents pays africains, tels que le Ghana, et rendrait, en association avec un quadruple mutant, les parasites « super résistants » (70). Cela compromet l'efficacité du TPI et nécessite une réévaluation de son utilisation dans ces régions. Heureusement, cette mutation reste encore rare en Afrique de l'Ouest, probablement en raison de son impact significatif sur la capacité

du parasite à survivre et à se reproduire. Elle est en revanche répandue en Afrique de l'Est et en Asie (68). Il en est de même pour la mutation *Pfdhps* A581G pour laquelle la prévalence dépassait 10 % dans plusieurs foyers. Il serait lui aussi responsable de la formation de parasites « super résistants ». Dernièrement, un mutant sextuplé (*Pfdhfr* S108N, C59R, N51I en association avec les *Pfdhps* A437G, K540E, A581G) a été découvert en Tanzanie et au Malawi, et est associé à un risque d'infection plus importante et à une parasitémie élevée chez les femmes enceintes recevant le TPI, ainsi qu'à une inflammation placentaire plus intense (71).

La prévalence de la résistance est de manière générale plus élevée en Afrique de l'Est que dans les autres régions d'Afrique, s'expliquant par une utilisation prolongée de la sulfadoxine-pyriméthamine dans cette région.

En Afrique de l'Est, les combinaisons de mutations majoritairement identifiées sont le triple mutant *Pfdhfr* N51I, N59R et S108N (CIRNI) associé à des mutations *Pfdhps* A437G (ISGKAA) ou K540E (ISAEAA). En effet, la quadruple mutation CIRNI/ISAEAA a été retrouvée à une fréquence élevée, avec une prévalence de 100 % en Ouganda et de 85,7 % au Mozambique (68). De plus, trois zones déjà résistantes ont acquis des mutations supplémentaires les rendant « super résistantes » (70). Il a été également observé au Kenya que le retentissement de la mutation S108N sur la sensibilité de la pyriméthamine *in vitro* était plus important que celui des mutations N51I et de C59R.

En Afrique Centrale ainsi qu'en Afrique de l'Ouest, c'est la combinaison du triple mutant et de la mutation *Pfdhps* A437G qui est la plus retrouvée (68). Effectivement, dans une étude réalisée en Afrique Centrale entre 2016 et 2021, la mutation A437G de la *Pfdhps* était la plus courante, avec une prévalence de 83,3% (69). Cela a conduit à une domination de l'haplotype ISGKAA, sauf au Tchad et en République Centrafricaine où l'haplotype IAAKAA (mutant S436A) prédominait (69). Il a été noté en Angola que la présence de *Pfdhps* A437G pourrait favoriser à terme une éventuelle évolution vers des mutations quintuples (55).

En Chine, plusieurs études ont été menées récemment sur des patients ayant voyagé en Afrique (43,68). L'une des études a mis en lumière une prévalence significativement plus élevée du quadruple mutant IAAKAA/CIRNI en Afrique centrale tandis que les haplotypes quintuples mutants (IAGKAA/CIRNI) étaient beaucoup plus courants en Afrique de l'Ouest, notamment au Ghana (43). Etant donné qu'il s'agit d'un nouvel haplotype, il est nécessaire d'évaluer son impact clinique. Le peu de données disponibles à ce jour ne permet pas de corrélation à un haut niveau de résistance. A l'inverse, la mutation ISGEAA/CIRNI, bien que peu fréquente dans cette étude, serait, d'après différentes publications, prédictive d'un échec thérapeutique ainsi que d'une réduction de l'efficacité du TPI. Dans une autre

étude (68), les mutations les plus fréquemment observées dans la *Pfdhps* sont S436A et K540E. Concernant leur répartition géographique, on constate une nette prédominance de K540E (69,6%) par rapport à S436A (4,3%) en Afrique de l'Est, alors que cette tendance est inversée en Afrique de l'Ouest (51,8% pour S436A). En Afrique Centrale, K540E est le plus fréquent (27,5%), mais l'écart avec la prévalence de S436A (17,5%) est beaucoup moins important que dans les deux autres régions (68). K540E est par conséquent, plus courant en Afrique de l'Est et du Sud-Est, mais elle semble commencer à se propager, pouvant alors causer des problèmes pour l'utilisation des TPI (71).

Ces études mettent en lumière l'importance du suivi des marqueurs moléculaires de la résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine dans les différentes régions d'Afrique. Il sera essentiel de continuer à collecter des données pour orienter de manière optimale les recommandations concernant l'utilisation des TPI.

2.4.6. Résistance aux artémisinines et ses dérivés

2.4.6.1. Apparition de la résistance

Mise en évidence pour la première fois en 2008, la résistance partielle aux traitements à base d'artémisinine se caractérise cliniquement par un ralentissement de la clairance parasitaire après une monothérapie à l'artésunate ou suite à un traitement par une ACT (36). Cela peut se manifester par une demi-vie de clairance parasitaire supérieure à 5 heures, en sachant qu'ils sont habituellement éliminés en moins de 2 à 3h, ou par la présence de parasites détectés au microscope sur un frottis sanguin le troisième jour après le début du traitement (43,44,45,51). L'augmentation de la clairance parasitaire n'est pas systématiquement associée à un échec thérapeutique, le médicament partenaire restant toujours efficace. Dans la région de l'Asie du Sud-Est, un taux élevé d'échec thérapeutique de l'ACT n'a été observé que lorsque la résistance au médicament partenaire était présente, indépendamment de l'existence d'une résistance à l'artémisinine (72). Cependant, au fil du temps, la résistance à l'artémisinine a facilité l'émergence et la sélection d'une résistance aux médicaments partenaires, notamment par l'exposition importante du parasite à ces molécules. Au Cambodge par exemple, le maintien de l'utilisation de protocoles thérapeutiques inefficaces n'a fait qu'aggraver la propagation de la résistance. En outre, le recours à l'association atovaquone-proguanil en remplacement des ACT a conduit à l'émergence très rapide d'une résistance à l'atovaquone (11). À ce jour, aucun des schémas thérapeutiques actuellement préconisés n'a permis d'atteindre des taux de guérison satisfaisants (>90 %).

2.4.6.2. Test de survie au stade annulaire

La mise en évidence de la résistance *in vitro* aux dérivés de l'artémisinine est possible par le test de survie au stade annulaire (RSA). Il permet d'imiter la courte exposition des parasites à une concentration plasmatique élevée d'artémisinine.

Les parasites sont cultivés pendant plusieurs semaines et sont synchronisés au stade précoce de l'anneau, de 0 à 3 heures après l'invasion des globules rouges, la résistance se manifestant principalement à ce stade-là. En effet, la distinction entre les parasites sensibles et résistants ne serait pas possible aux stades intermédiaire (9 à 12 heures) et tardif du cycle (18 à 21 heures). Les parasites sont ensuite exposés à une concentration de dihydroartémisinine à une concentration efficace (700 nM) pendant 6 heures, puis cultivés pendant 66 heures supplémentaires. Le pourcentage de parasites survivant est alors évalué au microscope en comparaison à des parasites exposés au DMSO, un solvant inerte de la dihydroartémisinine (47,72), avec une résistance posée lorsque le taux de survie est supérieur à 1%.

2.4.6.3. Mécanisme de résistance : mutation du gène *Pfkelch13*

Les mécanismes sous-jacents de la résistance partielle aux dérivés de l'artémisinine ne sont pas encore complètement élucidés, mais plusieurs facteurs pourraient être impliqués, en particulier la mutation du gène *Pfkelch13*. De ce fait, la relation causale entre certaines mutations sur ce gène et la résistance a été validée *in vitro* (48), une mutation équivalent à un clone du parasite.

2.4.6.3.1. Structure et mécanisme d'action

Le gène *Pfkelch13* (PF3D7_1343700), situé sur le chromosome 13, code pour la protéine PfKelch13, composée de 726 acides aminés (19,49) (Figure 28). Elle est composée d'un domaine spécifique au *Plasmodium*, d'un domaine BTB-POZ (codon 1 à 440) ainsi que d'un domaine Kelch comprenant 6 hélices (très souvent β) (codon 441 à 726) (73).

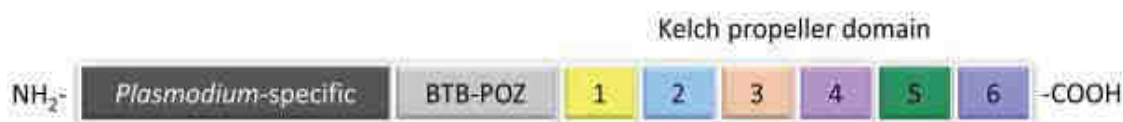


Figure 28 : Structure de la protéine PfKelch13 (50)

Elle est impliquée dans la dégradation de protéines parasites pourtant essentielles à la survie du parasite, en facilitant leur ubiquitinylation et leur reconnaissance par le protéasome. En effet, le domaine BTB est associé, via la culline, à une ubiquitine (Figure 29) (19). Ainsi, cette protéine exerce une influence importante sur l'efficacité des dérivés de l'artémisinine. Les protéines qui auront interagi avec les radicaux libres générés par le traitement se lieront au domaine Kelch et seront ensuite dégradées par le protéasome.

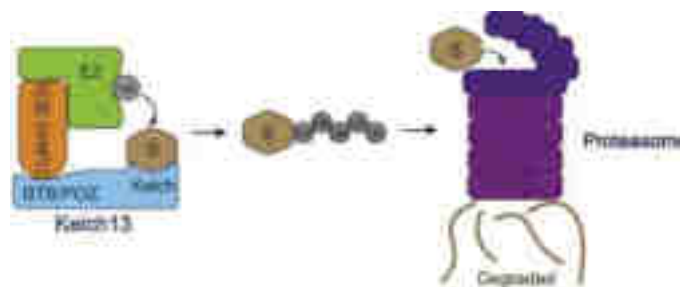


Figure 29 : Structure et mécanisme d'action de la protéine PfKelch13 (49)

De même, la protéine PfKelch13, mise en évidence au niveau du cytotosome du parasite, semble jouer un rôle primordial dans la régulation de l'absorption de l'hémoglobine (49) (Figure 30). Effectivement, des études ont permis d'observer son importance dans la régulation de l'endocytose.

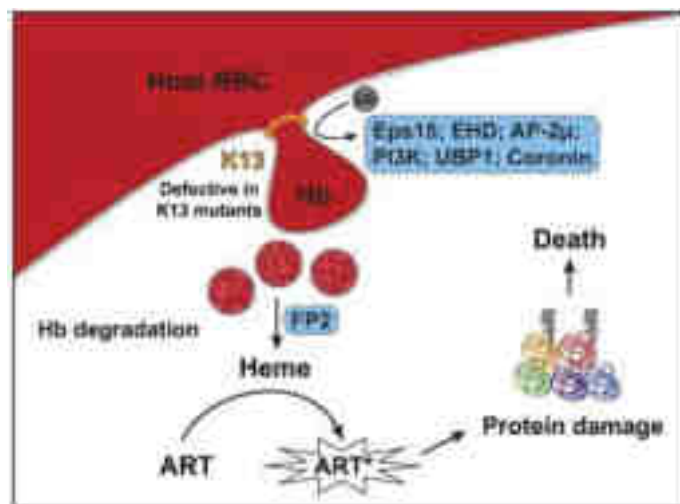


Figure 30 : Implication de PfKelch13 dans l'absorption de l'hémoglobine et sa participation dans l'activité des artémisinines (49)

Ce processus, ayant lieu lors du stade annulaire précoce, impliquerait également plusieurs autres protéines, faisant partie du « compartiment Kelch », telles que l'Eps15, la protéine EHD, AP-2 μ , la coronine/actine, UBP1, et la PI3K. Ces protéines pourraient ainsi être impliquées dans la résistance aux artémisinines (74).

La protéine PfKelch13 est pourtant en mesure de détecter les radicaux libres produits par les dérivés de l'artémisinine, en changeant de conformation et en libérant des facteurs de transcription de gènes contre les dommages oxydatifs. Toutefois, l'effet des dérivés de l'artémisinine étant extrêmement puissant et rapide, ce système n'a pas le temps de se mettre en place.

2.4.6.3.2. Localisations et impacts des mutations

Les mutations sont regroupées en deux endroits principaux (Figure 31) :

- Soit à la surface du domaine de Kelch, où elles pourraient altérer et réduire l'interaction de PfKelch13 avec le substrat présenté pour l'ubiquitination, empêchant sa dégradation par le protéasome. Cela a pour effet d'augmenter la demi-vie du parasite et de favoriser sa survie (19).
- Soit dans le noyau de l'hélice, où elles pourraient déstabiliser sa structure et être à l'origine d'une diminution partielle de son activité. Une réduction de presque 50% de son activité a pu être observée en comparaison aux niveaux rapportés lors de l'absence de mutations (49).

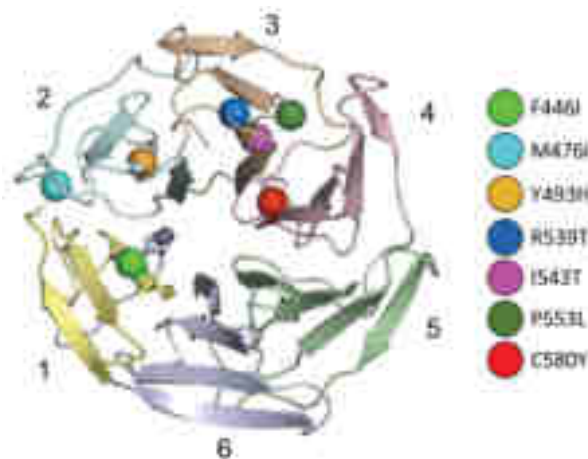


Figure 31 : Schéma illustrant le gène Pfkkelch13 ainsi que la localisation des différentes mutations (19)

Afin de simuler cette diminution et de mesurer son impact sur la résistance aux artémisinines, un modèle robuste avec la protéine PfKelch13 non mutée, mais mal localisée à 50% a été mis en place et a permis de mettre en évidence la présence d'une résistance au stade annulaire précoce malgré l'absence de

mutations (74). Également, lors de la surexpression de la protéine Kelch13 mutée, les parasites devenaient sensibles (49).

La corrélation exacte entre les mutations du gène *Pfkelch13* et la résistance à l'artémisinine est encore à étudier et plusieurs choses restent encore à élucider.

Plusieurs hypothèses ont été avancées (19,50,74) :

- Une diminution de l'activation de l'artémisinine, pouvant s'expliquer par un défaut dans l'endocytose et le catabolisme de l'hémoglobine
- Une meilleure réponse au stress cellulaire en augmentant le niveau de stress de base, aboutissant à une réduction des dommages ou à une récupération plus efficace
- Une réponse protéique non repliée régulée positivement
- Une réduction de la traduction des protéines
- Des altérations dans la réplication de l'ADN
- Une élévation des taux de phosphatidylinositol 3-phosphate (*PfPI3K*)

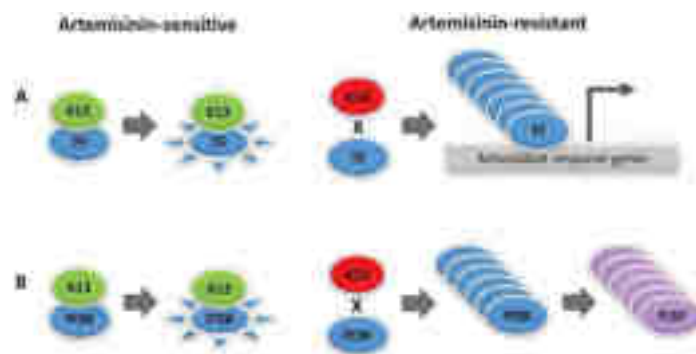


Figure 32 : Autres hypothèses de l'impact de la mutation de *Pfkelch13* sur la résistance aux artémisinines (50)

D'après Fairhurst (2015) (Figure 32), la protéine PfKelch13 non mutée se lie à un facteur de transcription hypothétique ainsi qu'à la protéine PfPI3K et les cible pour leurs dégradations (50). À l'inverse, chez les parasites résistants à l'artémisinine, les mutations de *Pfkelch13* perturbent l'interaction entre la protéine et ces 2 structures, empêchant leurs liaisons et conduisant ainsi à une meilleure réponse face au stress oxydatif induit par les artémisinines. En outre, le facteur de transcription va pouvoir réguler positivement les gènes impliqués dans la réponse antioxydante. Il sera également observé en parallèle une augmentation de PfPI3K et de PI3P, jouant comme vu précédemment un rôle à la croissance parasitaire.

2.4.6.4. Les marqueurs de résistance identifiés

Au niveau mondial, plus de 260 mutations non-synonymes dans le gène *Pfkelch13* ont été recensées (53). Elles ne sont toutefois pas forcément toutes associées à une résistance partielle à l'artémisinine. Parmi elles, 13 mutations ont été confirmées pour conférer une résistance et 8 sont associées à une résistance (Tableau 2) (48,53). La mutation majeure C580Y est prédominante dans environ 80% des souches résistantes en Asie du Sud-Est. Cette mutation peut entraîner des niveaux élevés de résistance, bien que cela varie en fonction du patrimoine génétique du parasite. Les mutations R539T et I543T présentent quant à elles une prévalence aux deuxième et troisième rangs respectivement (19).

Tableau 2 : Liste des mutants *Pfkelch13* « validé » et « candidat ou associée » selon l'OMS (3,53)

Validé		Candidat ou associé	
F446I	P553L	P441L	V568G
N458Y	R561H	G449A	
C469F/Y	P574L	A481V	
M476I	C580Y	R515K	
Y493H	R622I	P527H	
R539T	A675V	N537I/D	
I543T		G538V	

Les critères de classification des marqueurs ont été définis par l'OMS. Les marqueurs candidats ou associés doivent présenter soit une association statistiquement significative entre une mutation de *Pfkelch13* et une demi-vie d'élimination > 5 heures ou une parasitémie à J3 sur au moins 20 cas cliniques (résistance *in vivo*), soit un taux de survie supérieur à 1% en utilisant le test RSA (0-3h) sur au moins cinq échantillons avec une mutation donnée (résistance *in vitro*). Les marqueurs validés doivent quant à eux remplir les 2 critères précédents.

La réalisation des tests d'efficacité thérapeutique (TES) permet de suivre la propagation de la résistance et d'adapter le traitement mis en place dans la région concernée. En effet, une modification des directives nationales de traitement est recommandée par l'OMS lorsque le taux d'échec aux TES dans une zone dépasse 10% ou lors d'une forte augmentation de ce taux, même si ce taux reste inférieur à 10% (53).

La définition des marqueurs liés à la résistance à l'artémisinine est un domaine en constante évolution, à mesure que de nouvelles mutations sur le gène *Pfkelch13* sont mises en évidence et que des études approfondies en étudient les impacts. De plus, la résistance à l'artémisinine est un phénomène complexe, influencé par une multitude de facteurs interdépendants. L'élaboration de critères de résistance précis nécessitera une approche globale intégrant les avancées dans la compréhension des mécanismes génétiques, la pharmacologie, l'immunologie et d'autres domaines connexes. En réalité, l'utilisation de critères phénotypiques, notamment le RSA, sont soumis à différentes influences difficilement quantifiables telles que les effets des médicaments partenaires, des doses insuffisantes d'ACT et la présence de mutations « associées » qui n'ont pas encore été « validées ». Une vigilance constante et une adaptation agile des stratégies de lutte contre le paludisme sont indispensables pour faire face à l'évolution de cette menace sanitaire.

2.4.6.5. Situation en Asie du Sud-Est

En Asie du Sud-Est, une différence de sensibilité significative existe entre les pays faisant partie du Grand Mékong et les autres. Ce facteur ne doit donc pas être négligé dans l'analyse des résistances dans la région.

Au sein du Grand Mékong, nous retrouvons Yunnan (situé en Chine), la Birmanie, le Laos, la Thaïlande, le Cambodge et le Viêt Nam. Les recommandations thérapeutiques vont varier d'un pays à l'autre, et cela en fonction des taux d'échec signalés dans ces pays. La Birmanie recommande actuellement trois traitements en première intention, notamment l'artéméther-luméfantrine, l'artésunate-méfloquine ou la dihydroartémisinine-pipéraquline, pour lesquels les taux d'échecs étaient relativement faibles. La Thaïlande en revanche ne recommande que la dihydroartémisinine-pipéraquline. En effet, l'artésunate-méfloquine, qui était le traitement de première intention jusqu'en 2015, a été arrêté à la suite de la mise en évidence de taux d'échecs bien trop élevés. Il en était de même pour l'artéméther-luméfantrine en 2012. De surcroît, des taux d'échecs importants à la dihydroartémisinine-pipéraquline ont commencé à être signalés à la frontière entre la Thaïlande et le Cambodge, obligeant une modification de la stratégie thérapeutique et le remplacement du traitement en 2018 par de l'artésunate-pyronaridine. En ce qui concerne la circulation de la résistance, presque 45% des échantillons ont des mutations de *Pfkelch13* (53). Plusieurs de ces mutations ont été identifiées en premier lieu au Cambodge, telles que Y493H, R539T, I543T et C580Y. La mise en évidence de leur implication dans la résistance partielle à l'artémisinine fait suite à une étude réalisée par Ariey *et al.*, suite à leurs intégrations à une lignée tanzanienne sauvage (F32) (75). Effectivement, les mutations Y493H, R539T, I543T et C580Y ont été liées à un ralentissement de la clairance du parasite chez les patients *in vivo* (53).

Plusieurs autres mutations ont été découvertes par la suite. La mutation la plus répandue en Thaïlande est C580Y tandis que F446I, accompagné de R561H et P574L, sont plutôt retrouvés en Birmanie. Elles correspondent toutes les quatre à des marqueurs de résistances validés par l’OMS. La mutation R561H avait été détectée essentiellement dans l’ouest du Grand Mékong, en Birmanie et en Thaïlande. Nous y retrouvons également le mutant A675V. Toutefois, le mutant asiatique aurait montré une origine bien distincte du mutant ougandais. Quant à C469Y, il a été repéré de manière sporadique en Asie du Sud-Est. Ces observations soulignent la diversité et la dispersion géographique importante de ces mutations (voir Annexe 1).

2.4.6.6. Situation en Afrique

Les ACT recommandées actuellement en première intention par l’OMS en Afrique sont l’artéméther-luméfantrine (AL), l’artésunate-amodiaquine (ASAQ), l’artésunate-pyronaridine (AS-PY) et la dihydroartémisinine-pipéraquline (DHA-PPQ). Leur efficacité a été attestée par la réalisation de TES selon le protocole standard de l’OMS (Figure 33). Il y a toutefois des taux d’échecs élevés (supérieurs à 10%) de l’artéméther-luméfantrine et de la dihydroartémisinine-pipéraquline, au Burkina Faso essentiellement ainsi qu’en Ouganda, qui ont été observés dans six études réalisées entre 2015 et 2020.



Figure 33 : Nombre de TES sur *P. falciparum*, incluant au moins 20 patients et les taux d’échecs rapportés en Afrique selon l’ACT employé entre 2015 et 2021 (3)

Il avait tout d’abord été rapporté par l’OMS, en 2013, deux cas assez peu convaincants de patients ayant voyagé en Afrique et n’ayant pas répondu aux traitements habituels (76), un patient vietnamien revenant d’Angola ne répondant ni à l’artésunate IV, ni à la dihydroartémisinine-pipéraquline ainsi qu’un patient

chinois ayant développé un paludisme huit semaines après son retour de Guinée équatoriale. Il aurait répondu à la dihydroartémisinine-pipéraquine, mais présentait toujours une parasitémie à J3 du traitement et le mutant M579I avait été mis en évidence. Ce mutant n'avait été retrouvé qu'une seule fois en Birmanie et d'autres enquêtes réalisées en Guinée équatoriale ne l'ont pas retrouvé par la suite. Les autres cas d'échecs thérapeutiques signalés (patients traités à la dihydroartémisinine-pipéraquine ou à l'artéméther-luméfantrine) n'ont pas retrouvé de mutations *Pfkelch13* associées.

Des mutations de l'hélice *Pfkelch13*, variées, mais peu fréquentes, ont depuis été signalées en Afrique et il n'y aurait pour le moment aucune preuve de sélection, même dans les régions où les ACT ont été largement déployés. Les mutations ayant récemment émergé sont M476I, P553L, R561H et P574L. La mutation M476I est en corrélation avec une tolérance à l'artémisinine en culture *in vitro* (53).

L'OMS a recensé dans un rapport plusieurs études, réalisées entre 2010 et 2019, afin de faire un point sur les différentes résistances qui circulent actuellement dans le monde et de surveiller leur propagation, telles que la résistance partielle à l'artémisinine ou celles aux médicaments partenaires (53). D'autres études ont également effectué ce travail d'investigation, dont les résultats seront évoqués ci-après.

2.4.6.6.1. Afrique de l'Est

L'ACT la plus recommandée dans une grande partie des pays d'Afrique de l'Est est l'artéméther-luméfantrine. Les TES menées ont montré un taux d'échec à ce traitement supérieur à 10% dans 2 pays, au Malawi en 2010 (19,5%) et en Ouganda en 2015 (13,9%). Cependant, des études réalisées plus tard ont démenti ces données, retrouvant un taux d'échec de 4,3% au Malawi en 2012 et de 5,1% en Ouganda en 2015. D'autres études ont trouvé également des taux d'échec proches de 10%, notamment au Kenya avec un taux de 9,0%.

Concernant l'artésunate-amodiaquine, la dihydroartémisinine-pipéraquine et l'artésunate-pyronaridine, toutes les études retrouvaient des taux inférieurs à 10% (53).

Pour ce qui est des marqueurs de résistances observées en Afrique de l'Est, la mutation P574L avait été signalée au Rwanda (2013 et 2015) et en Ouganda (2012), mais elle n'était présente que dans un seul échantillon à chaque fois et n'a plus été détectée par la suite.

L'une des premières études du polymorphisme de l'hélice *Kelch13* en Afrique réalisée en 2015 avait permis de mettre en lumière le marqueur validé P553L, mutant qui sera observé à de très faibles fréquences au Kenya ainsi qu'au Malawi (77).

L'OMS a, dans son dernier rapport, confirmé la présence de plusieurs marqueurs validés (3) (Figure 34). En effet, les mutations R561H au Rwanda, R622I en Érythrée et A675V et C469Y en Ouganda ont été mises en évidence avec une prévalence supérieure à 5%.



Figure 34 : Répartition des mutations *Pfk13* ayant une prévalence supérieure à 5% en d'Afrique d'après l'OMS (2015-2020) (3)

La mutation R561H est observée au Rwanda entre 2012 et 2018, avec une prévalence allant jusqu'à 22% dans certaines zones, confirmant pour la première fois la présence d'une résistance partielle en Afrique (48,53). Cette mutation a été validée dans la région du Grand Mékong et en Afrique, avec une parasitémie importante au troisième jour et un allongement de la demi-vie parasitaire sous artéméthér-luméfantine (47,78). Elle a également montré un niveau de résistance similaire à la mutation C580Y ainsi qu'un faible impact sur la capacité de survie du parasite, présageant une prédominance de la lignée rwandaise contenant la mutation R561H dans les années à venir (47).

Une enquête réalisée au nord de l'Ouganda entre 2017 et 2019 par Balikagala *et al.* (79) a permis l'identification de deux marqueurs validés, A675V et C469Y, à une prévalence de 23% et de 41%, respectivement, montrant un phénotype de résistances *in vitro*. D'autres isolats provenant d'un autre site, toujours au nord de l'Ouganda, auraient montré une résistance *in vitro* et *ex vivo* en présence de ces marqueurs (78). Pour l'instant, grâce à l'efficacité conservée des médicaments partenaires, les taux d'échec de traitement au Rwanda et en Ouganda sont restés en dessous de 10% (53).

Enfin, la mutation R622I a été observée très récemment dans la région de la Corne de l'Afrique, comprenant quatre pays : la Somalie, Djibouti, l'Éthiopie et l'Érythrée. Notamment, en 2019, en Érythrée, cette mutation a été détectée à une fréquence élevée (21 %). On a également constaté que 16,9 % des parasites porteurs de cette mutation présentaient en parallèle des délétions dans les gènes *Pfhrp2* et *Pfhrp3*, les rendant alors indétectables par les tests de diagnostic rapide (TDR) basés sur PfHRP2. En réponse à cette situation, l'Érythrée a modifié sa politique en 2016 en faveur de l'utilisation de TDR basés plutôt sur la pLDH (80).

2.4.6.6.2. Afrique centrale

Contrairement à l'Afrique de l'Est, c'est l'utilisation de l'artésunate-amodiaquine qui est privilégiée dans la grande majorité des pays d'Afrique Centrale, l'artéméther-luméfantrine n'étant recommandé que dans 3 pays.

Des taux d'échecs élevés (supérieurs à 10%) avec l'artéméther-luméfantrine ont été rapportés au Nord de l'Angola en 2013 et en 2015. Cependant, ces taux n'ont pas été retrouvés dans une étude menée en 2017. Cette variation pourrait s'expliquer par un non-respect du protocole standard de l'OMS pour les TES. Concernant l'artésunate-amodiaquine et la dihydroartémisinine-pipéraquline, les taux d'échecs des diverses études étaient inférieurs à 10% (53).

Sur une soixantaine de mutations *Pfkelch13* identifiées dans cette région, quarante-cinq n'avaient été retrouvées que dans un seul échantillon et six parmi elles s'étaient révélées significatives. En effet, cinq d'entre elles correspondaient à des marqueurs validés tandis qu'une était considérée comme un marqueur candidat de la résistance partielle à l'artémisinine. Ces mutations avaient été repérées chez des voyageurs de retour de Guinée équatoriale, incluant les marqueurs validés M476I et P574L ainsi que C469F qui est un marqueur candidat. De plus, les marqueurs validés P553L et R539T avaient été identifiés chez des voyageurs revenant d'Angola. Toutefois, deux TES qui ont été menées par la suite en Guinée équatoriale en 2017 et 2018 n'ont retrouvé aucun marqueur de résistance, y compris la mutation M579I qui avait été mise en évidence chez le voyageur chinois en 2013. De même, en Angola, aucun des marqueurs précédemment signalés n'a été retrouvé (53).

En 2015, une étude menée en Afrique subsaharienne a identifié la mutation A557S dans une province de la République démocratique du Congo, le Bas-Congo, à des fréquences significatives (36,3 %) (77). Il n'a cependant pas été retrouvé dans les provinces voisines de Kinshasa et de Bandundu. À ce stade, il n'a pas été démontré que ce phénotype soit associé à une résistance particulière. Cependant, en raison de sa fréquence élevée et de son emplacement dans un domaine de l'hélice de *Pfkelch13*, proche de deux

substitutions de résistance à l'artémisinine (R539T et I543T), l'étude suggérait une caractérisation plus approfondie de ce mutant (77). Toujours en République démocratique du Congo, l'identification du marqueur validé R561H a été rapportée en 2012, mais sur un seul échantillon (53), ne permettant pas de conclure sur la présence généralisée de celui-ci dans le pays.

En Angola, une étude menée sur une centaine de patients infectés a recherché la présence de marqueurs de résistance, avant et après l'introduction des ACT (55). Les résultats ont montré que la majorité des séquences étaient du type sauvage. Seules deux mutations synonymes ont été mises en évidence (R471R et R575R). Cette analyse a permis de mettre en lumière une faible variabilité génétique dans ces régions, l'introduction des ACT n'ayant pas semblé exercer de pression sélective notable sur ces gènes spécifiques. La mutation Q613E, détectée en Angola ainsi qu'en République démocratique du Congo, n'a, à ce jour, pas été associée à une quelconque résistance *in vivo* ou *in vitro* (53).

2.4.6.6.3. Afrique de l'Ouest

Les recommandations dans cette région sont plus variées. En effet, soit l'artéméther-luméfantrine soit l'artésunate-amodiaquine sont prescrits, avec un pays utilisant également la dihydroartémisinine-pipéraquline. À la suite de plusieurs TES, un taux d'échec de 11,9% à l'artéméther-luméfantrine avait été retrouvé en Gambie en 2010, mais qui n'a pas été confirmé par les différentes études qui ont suivi, retrouvant toutes des taux d'échec assez faibles ($\leq 2,7\%$). L'artésunate-amodiaquine ne recense, quant à elle, aucune étude avec un taux d'échec supérieur à 10%. D'autres ACT ont été testés dans la région et aucun n'a montré de taux d'échecs significatifs.

Trois marqueurs validés avaient été détectés, M476I en 2018 dans un échantillon au Nigeria (2,0%) et R539T et C580Y au Ghana en 2013, à de très faibles fréquences (0,9% et 2,7% respectivement). Ces 2 derniers marqueurs n'ont néanmoins pas été détectés dans les échantillons analysés depuis lors (53).

2.4.6.6.4. Récapitulatif de la situation en Afrique

Ces différentes études attestent donc de la présence de mutants *Pfkelch13* en Afrique conférant une résistance partielle à l'artémisinine *in vitro* et *in vivo*, sans entraîner pour l'instant d'échecs thérapeutiques. De plus, elle reste pour l'instant cantonnée à l'Afrique de l'Est. Bien que la prévalence soit actuellement faible, l'émergence du marqueur validé R561H au Rwanda soulève des inquiétudes quant à la possibilité d'une propagation importante de la résistance. Il sera donc essentiel de surveiller de près la propagation de cette résistance en Afrique et d'explorer les facteurs qui pourraient influencer

sa diffusion. Nous pouvons faire un parallèle avec la résistance à la chloroquine qui s'est finalement répandue en Afrique, 20 ans après son apparition en Asie du Sud-Est. Cela avait abouti à cette époque-là à une augmentation considérable de la mortalité, étant recommandé comme traitement de première intention.

Voici ainsi un tableau récapitulatif reprenant toutes les mutations retrouvées actuellement en Afrique subsaharienne (Tableau 3).

Tableau 3 : Récapitulatif des marqueurs de résistance retrouvés en Afrique subsaharienne

	Afrique de l'Est	Afrique Centrale	Afrique de l'Ouest
<i>Pfcr</i>	M74I, N75E, K76T		
<i>Pfmdr1</i>	N86Y, Y184F, D1246Y Amplifications		
<i>Pfpm2/3</i>	Amplifications		
<i>Pfdhfr</i>	N51I/C59R/S108N		
<i>Pfdhps</i>	A437G / K540E	A437G	
<i>Pfkelch13</i>	R561H, R622I, A675V, R469Y	/	/

Un élément rassurant, toutefois, est le fait qu'aucune résistance à la luméfantrine n'ait été observée pour l'instant. Comme vu précédemment, elle est, en association avec l'artéméther, l'ACT la plus couramment utilisée en Afrique.

2.4.7. Paramètres impactant sur la propagation de la résistance

La propagation de la résistance est influencée par plusieurs facteurs. Elle repose sur une série de paramètres influant sur la capacité de survie, de reproduction et de transmission de gènes mutés aux générations suivantes des parasites.

Ces facteurs se divisent en deux catégories : d'une part, les facteurs contextuels qui sont liés aux contextes génétiques du parasite et de l'hôte, ainsi qu'à l'environnement ; et d'autre part, les facteurs liés au traitement (51).

Le contexte génétique du parasite joue un rôle important dans la manière dont une mutation va affecter sa sensibilité aux médicaments et sa capacité à se propager. Certaines mutations additionnelles peuvent renforcer la compétitivité des parasites résistants, même en l'absence de pression médicamenteuse. Cela

signifie que l'impact et le potentiel de propagation d'une mutation peuvent différer d'une souche à l'autre, expliquant la présence de marqueurs de résistance différents d'une région à l'autre. Cette diversité génétique peut avoir des implications significatives sur l'efficacité des stratégies de lutte contre la résistance aux antipaludiques. Ainsi, l'étude de l'impact des mutations *Pfkelch13* sur ces différentes lignées de parasites pourrait nous aider à mieux comprendre et à mieux anticiper les dynamiques de résistance. Ce qui sera appelé le « *fitness cost* » en anglais, que nous pourrions traduire par « coût biologique de la mutation » correspond à la réduction de la capacité d'un organisme porteur d'une mutation à survivre et à se propager par rapport à un individu non porteur. Pour les mutations de *Pfkelch13*, cela se traduit par un ralentissement de la croissance parasitaire, bien que l'impact puisse varier selon la lignée parasitaire touchée, ainsi que par une prévalence et un niveau de transmission diminué du parasite (47).

Parmi les différentes lignées identifiées ces dernières années, celle qui est la plus souvent étudiée est la lignée sauvage 3D7, originaire d'Afrique.

Tableau 4 : Présentation de lignées de *Plasmodium falciparum* circulant en Afrique (47)

Parasite	Origine géographique	Année	<i>Pfkelch13</i>	<i>Pfprt</i>	<i>Pfmdr1</i>	Copies <i>Pfmdr1</i>	<i>Pf dhfr</i>	<i>Pf dhps</i>
3D7 ^{SS}	Afrique	1981	SS	SS	SS	1	SS	SS
F32 ^{SS}	Tanzanie	1982	SS	SS	SS	1	SS	S436A
UG659 ^{SS}	Ouganda	2007	SS	GB4	Y184F/Y927N	1	Triple	K540E
UG815 ^{SS}	Ouganda	2008	SS	GB4	N86Y/D1246 Y	1	Triple	K540E

SS = Souche sauvage

Il a été observé que les mutations *Pfkelch13* R561H n'impactait pas significativement sur la lignée 3D7 contrairement aux mutations C580Y et M579I, pour un même niveau de résistance *in vitro*. Cette observation met en évidence l'une des raisons de la rapide propagation de cette mutation au Rwanda et souligne la nécessité de surveiller de près ce marqueur. Cela permettra de comprendre en détail les mécanismes de diffusion et d'adapter les mesures de contrôle en conséquence pour prévenir une éventuelle généralisation de la résistance.

Il est à noter les parasites de la lignée tanzanienne F32, contrairement aux autres lignées africaines, n'avaient pas montré de résistances *in vitro* en présence de ces 3 mutations (47).

Au sujet des mutations M579I et C580Y, elles provoquaient toutes deux une diminution de la proportion des lignées testées, les plus importantes ayant été observées chez les lignées 3D7 ou UG815. Ces différentes données nous permettent de comprendre pourquoi ces mutations n'ont pas réussi à se s'installer en Afrique pour l'instant, malgré leur forte prévalence en Asie du Sud-Est. En revanche, il a été constaté un impact minime de ces mutations sur la vitalité de l'UG659, surtout pour C580Y. Il existe donc une possibilité non négligeable que cette mutation émerge et se propage au sein de cette lignée.

En ce qui concerne l'impact des mutations d'autres gènes mentionnés précédemment sur la survie du parasite, il est important de noter celui du gène *Pfcr* et *Pfdhfr*. Comme en témoigne la diminution de la prévalence de la résistance à la chloroquine depuis l'arrêt de son utilisation, le gène *Pfcr* entraîne bien une répercussion importante sur la survie du parasite. Il en est de même pour la mutation I164L du gène *Pfdhfr*, qui s'est montrée rare en Afrique, principalement en raison du coût de survie trop élevé dans les zones de fortes compétitions entre les parasites au sein de l'hôte (20). Cette diversité génétique de *P. falciparum* plus élevée en Afrique, due à une transmission plus intense, pourrait contribuer à limiter la propagation de la résistance. D'autres recherches seront nécessaires afin de repérer les autres facteurs génétiques qui pourraient être impliqués dans le renforcement et la propagation de la résistance.

2.4.8. Perspectives envisageables contre la propagation de la résistance

Les nouvelles stratégies de lutte contre la propagation du paludisme et de ces résistances se concentrent sur plusieurs aspects : la recherche de nouvelles approches thérapeutiques, le développement d'antipaludiques de nouvelles générations, la mise en évidence de nouveaux marqueurs de résistance pouvant être associés à ces traitements et la mise en place de nouvelles mesures de prévention (3).

2.4.8.1. Nouvelles approches thérapeutiques

Les avancées dans la compréhension des traitements antipaludiques existants ont permis une réflexion sur les nouvelles stratégies thérapeutiques pouvant être mises en place.

Tout d'abord, de nouvelles associations peuvent être testées. Par exemple, la combinaison de la dihydroartémisinine à la pyronaridine, un médicament partenaire dont l'utilisation est limitée à ce jour mais qui tend à être encouragée (20).

Ensuite, la mise en place d'une thérapie combinée triple à base d'artémisinine (TACT) a été proposée (3,81). Elle a pour objectif d'atténuer le risque de résistance en associant un dérivé de l'artémisinine à deux médicaments partenaires, en s'inspirant de ce qui est déjà fait pour d'autres microorganismes ayant posé des problèmes de résistance, tels que le VIH et *Helicobacter pylori* par exemple. La réalisation de combinaisons synergiques des antipaludiques a été réfléchi, en utilisant ensemble des molécules avec des pressions sélectives opposées. Cela a finalement abouti à la formation de deux TACT, l'artéméther-luméfantrine + amodiaquine et dihydroartémisinine-pipéraquline + méfloquine. Toutes deux sont en cours d'essai clinique (numéro d'essai clinique NCT02453308) et sont testées dans plusieurs sites avec une résistance à l'artémisinine de prévalence importante. L'artéméther-luméfantrine + amodiaquine a montré un niveau comparable à l'ACT classique. Elle est très bien tolérée et serait avancée comme un traitement de premier choix. La dihydroartémisinine-pipéraquline + méfloquine s'est quant à elle montrée plus efficace que l'ACT.

Enfin, une autre stratégie consisterait à associer l'ACT à une dose unique de primaquine ou de tafénoquine (82), pour bloquer la transmission du parasite.

2.4.8.2. Antipaludiques de nouvelles générations

Le développement de traitements antipaludiques de nouvelles générations offre des perspectives prometteuses pour faire face à l'émergence de nouvelles résistances chez *P. falciparum*. Plusieurs candidats se distinguent par leurs mécanismes d'action et leur efficacité contre les souches multirésistantes (3). Ils furent découverts pour la plupart grâce à un criblage des différentes cibles potentielles de *P. falciparum* (83).

Parmi eux, on peut citer l'association de la ganaplacide, qui agit en inhibant la dihydroorotate déshydrogénase (DHODH), à la luméfantrine (84). La DHODH est enzyme nécessaire à la synthèse des pyrimidines, composants essentiels de l'ARN et de l'ADN (85). Cette association présente une prise facilitée par rapport à l'ACT classique (1/j au lieu de 2/j avec l'artéméther), avec le potentiel de bloquer la transmission du parasite.

De même, le M5717, une quinoléine-4-carboxamide, entraîne l'inhibition du facteur d'élongation de traduction 2 (eEF2) (86). Il a l'avantage d'être efficace également sur les stades hépatiques, et sur les stades sexués. En association avec la pyronaridine, il offre un schéma posologique plus court et la capacité de prévenir le paludisme, en plus de son efficacité contre les souches multirésistantes (3).

Le ZY19489, une triaminopyrimidine, nouvelle classe d'antipaludique dont le mécanisme d'action n'a pas encore été élucidé à ce jour, en combinaison avec la ferroquine, une nouvelle 4-aminoquinoléine, a une action antipaludique très puissante et pourrait être prescrit en dose unique (83). Il n'y a, à ce jour, aucune résistance *in vitro* qui aurait été rapportée (87).

Enfin, le cipargamine, un inhibiteur de la protéine PfATP4, qui est une pompe à efflux de sodium, agit rapidement et puissamment contre les souches résistantes. Le médicament partenaire en association avec cette molécule n'a pas encore été décidé (88).

À noter que le cipargamine et le ganaplacide ont une structure et un mécanisme totalement différents des dérivés de l'artémisinine, permettant donc de contourner la résistance les concernant. Il existe d'autres molécules candidates encore en phase préclinique actuellement (3,82).

Ces avancées promettent de considérablement améliorer l'efficacité des traitements antipaludiques. Toutefois, pour concrétiser ces progrès et garantir leur impact durable dans la lutte contre le paludisme, il sera primordial de maintenir une vigilance constante et de continuer à investir de manière soutenue, en mettant en place une coordination internationale et en investissant au niveau de la recherche, de la surveillance ainsi qu'au niveau d'une implication politique et financière.

2.4.8.3. Recherche de nouveaux marqueurs de résistance

Suite au développement de ces antipaludiques de nouvelles générations, qui ont des cibles différentes des traitements antipaludiques actuels, de nouveaux marqueurs de résistance liés à ces cibles ont été mis en lumière. Leurs études permettraient de surveiller l'apparition et la propagation de résistances à ces traitements innovants.

Le gène *Pfatp4*, situé sur le chromosome 12, code pour la protéine, l'ATPase 4 (PfATP4), une pompe à efflux de sodium spécifique de *P. falciparum*. Cela en fait donc une cible de premier choix (88). Des polymorphismes seraient déjà apparus, aboutissant à la résistance à la cipargamine et aux molécules associées (36,89).

Le gène *PfeEF2* code pour un facteur d'élongation de traduction 2 et est responsable de la translocation du ribosome le long de l'ARN messager, permettant ainsi la synthèse de protéines essentielles (90). Son inhibition va donc permettre d'empêcher cette synthèse protéique. Lors d'une première étude de l'efficacité de M5717, une recrudescence de cas avait été signalée, associée à la détection de mutations dans *PfeEF2* (86).

Pour terminer, le gène *Pfdhodh*, codant pour la dihydroorotate déshydrogénase (PFDHODH), une enzyme indispensable à la synthèse des pyrimidines. Son inhibition va donc permettre de bloquer la croissance du parasite. Malheureusement, des mutations ainsi que, à moindres mesures, des amplifications du gène ont été rapportées, entraînant une résistance aux inhibiteurs de la PFDHODH. Six mutations ponctuelles ont été révélées : E182D, F188I, F188L, F227I, I263F et L531F (91). Les parasites mutants, bien que résistants à l'un des traitements, étaient sensibles aux autres inhibiteurs de PFDHODH, mettant en évidence des pressions sélectives opposées entre les molécules testées. La mise en place d'un traitement combiné pourrait donc permettre de prévenir la résistance, préservant son efficacité. Également, une réduction de la croissance du parasite avait été observée, s'expliquant par une diminution de l'efficacité catalytique du parasite (91).

2.4.8.4. Nouvelles mesures de prévention

Une réflexion a été amenée par les différentes organisations de santé, telles que l'OMS et la Medicine for Malaria Venture (MMV) afin d'introduire de nouvelles stratégies destinées à la prévention du paludisme, telles qu'une amélioration de la chimioprophylaxie, la mise en place d'un vaccin efficace, ou encore l'utilisation d'anticorps monoclonaux (3).

2.4.8.4.1. Chimioprophylaxie

Les enfants, les femmes enceintes et les voyageurs non immunisés sont les principaux concernés par la mise en place d'une chimioprophylaxie dans les zones d'endémie et diverses stratégies ont été mises en place (3).

Tout d'abord, le traitement préventif intermittent avec la sulfadoxine-pyriméthamine lors de la grossesse va être essentiel pour protéger la femme enceinte. Le paludisme comporte, par l'anémie qu'elle entraîne, des risques importants, pouvant mener au décès de la mère ainsi qu'à celui du bébé. Un retard de croissance ainsi qu'une prématurité ont également été observées (92). Elle est recommandée depuis 2022 pour toutes les femmes enceintes, indépendamment du nombre de grossesses menées.

Ensuite, la chimioprévention des jeunes enfants à risque, dans les zones de transmission pérenne ou saisonnière. En effet, elle a démontré son efficacité comme une stratégie fiable, sûre et économiquement viable pour diminuer le fardeau de morbi-mortalité de la maladie.

Le développement de nouveaux médicaments peut impliquer la réévaluation de traitements antipaludiques existants, la combinaison de médicaments approuvés pour créer de nouvelles combinaisons ou encore la création de nouvelles combinaisons. Ainsi, une compréhension approfondie des marqueurs de la résistance aux antipaludiques permet d'optimiser leur efficacité et d'orienter les recherches à venir.

2.4.8.4.2. Développement d'un vaccin

Un tout premier vaccin antipaludique, le vaccin RTS,S/AS01, très récemment développé et d'une efficacité modérée, a été préconisé par l'OMS en 2021 et est destiné à être utilisé dans les régions d'Afrique subsaharienne à transmission moyenne ou élevée du paludisme (3). Seuls sa disponibilité et son déploiement dans ces zones d'endémie sont compliqués. En effet, sa production et sa distribution nécessitent des investissements financiers ainsi que politiques afin de favoriser son accessibilité. D'autres vaccins sont en cours de recherche à l'heure actuelle, qui cibleraient la phase pré-érythrocytaire du parasite, notamment les sporozoïtes et la phase hépatique. C'est le cas du vaccin R21/Matrix-M, très récemment recommandé par l'OMS, qui serait très prometteur. Il aurait en effet montré des niveaux d'efficacité élevés (80%), supérieur à l'objectif de 75% demandé par l'OMS (93,94). La découverte et le déploiement pour une utilisation élargie de ces vaccins permettraient une avancée majeure dans la diminution de l'impact du paludisme dans le monde.

2.4.8.4.3. Anticorps monoclonaux prophylactiques

Des perspectives d'immunisation passive à l'aide d'anticorps monoclonaux sont actuellement en développement et ouvriraient la voie à une protection à court terme pour les populations à haut risque. Cela pourrait être particulièrement crucial pour la protection des nourrissons et des enfants contre *P. falciparum*. Un nouveau test *in vitro*, corrélé à la protection fournie par l'anticorps testé *in vivo*, a été découvert et va permettre de faciliter la mise en évidence d'anticorps puissants (95).

2.4.8.5. Conclusion

Ainsi, la priorité immédiate en matière de santé publique est la réduction de la morbidité et de la mortalité du paludisme à *P. falciparum* chez les nourrissons et les enfants ainsi que chez les adultes, en mettant l'accent sur la prévention de l'infection chez les femmes enceintes ou allaitantes, les femmes en âge de procréer et d'autres populations adultes à haut risque ou vulnérables.

En combinant ces approches et en favorisant une collaboration globale, avec le maintien d'une vigilance continue et les investissements adéquats, il est possible de faire progresser dans la lutte contre le paludisme et de diminuer son impact sur la santé publique à l'échelle mondiale.

Partie 3 : Etude de l'évolution de la résistance aux antipaludiques aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

1. Introduction

L'évolution de la résistance aux antipaludiques constitue un enjeu crucial dans la lutte contre le paludisme. Aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, nous faisons face à un nombre croissant de cas de paludisme chaque année. En 2022, nous avons reçu 409 demandes de recherche de paludisme, en comptant les contrôles et une quarantaine de cas diagnostiqués cette année-là. Face à cette situation, il devient impératif de mener une évaluation rapide des résistances aux antipaludiques. Cette étude vise donc à analyser l'évolution de la résistance aux traitements antipaludiques et à évaluer l'impact de ces mutations sur la prise en charge thérapeutique des patients hospitalisés.

Dans cette perspective, nous entreprendrons une description épidémiologique complète des patients originaires d'Afrique hospitalisés au HUS, suivie d'une analyse détaillée de leur distribution en fonction des années et des régions touchées par la contamination. Cette approche nous permettra de contextualiser les données recueillies et d'identifier d'éventuelles tendances temporelles ou géographiques en matière de résistance aux traitements antipaludiques.

Par la suite, nous nous concentrerons sur l'analyse de l'évolution des résistances aux traitements antipaludiques, en mettant en lumière les résistances à l'artémisinine, qui est, comme vu précédemment, le traitement de référence contre les accès palustres à *P. falciparum*. Nous porterons une attention particulière à l'identification de marqueurs de résistance pertinents, dans le but de renforcer les stratégies thérapeutiques actuelles en fournissant des informations précises sur les profils de résistance observés.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Sélection des patients et recueil de données

Les patients sélectionnés pour cette étude ont été diagnostiqués aux HUS d'un paludisme à *P. falciparum* entre octobre 2010 et octobre 2022. Cette période correspond à celle durant laquelle les extraits et échantillons primaires ont été conservés à -80°C. Ainsi, les données de 425 patients ont été recueillies. L'infection a été diagnostiquée par examen microscopique, par une goutte épaisse et un frottis sanguin. Plusieurs données ont été recueillies, telles que l'âge, le sexe, les antécédents de voyage, la durée du voyage ainsi que la chimioprophylaxie et sa bonne prise (si prescrite et précisée).

Ils ont été ensuite triés selon le pays de provenance ou de voyage. Il a été décidé de répartir les patients par région géographique plutôt que par pays afin que le pool d'échantillon soit plus important et donc plus représentatif, tout en sachant que cela aura peu d'impact sur l'interprétation des résultats. L'Afrique a donc été divisée en 3 régions distinctes : l'Ouest, Centrale ainsi que l'Est. Cette répartition a été faite sur la base du découpage de l'Afrique par les Nations-Unies en 2017. Seuls les patients du Soudan ont été considérés comme faisant partie de l'Afrique de l'Est.

Ont été exclus de l'étude les patients :

- Ayant des antécédents de voyage complexes (passage par plusieurs pays)
- Ayant voyagé en dehors de l'Afrique subsaharienne



Figure 35 : Découpage de l'Afrique par l'ONU (96) (à gauche) et celui de l'étude (à droite)

Pour des questions de technicité et de budget, seuls 270 patients ont été sélectionnés aléatoirement, en prenant en compte seulement la répartition géographique, plus spécifiquement selon la région (Figure 35) et la période de diagnostic. Le tirage au sort a été réalisé sur Excel grâce à la fonction ALEA, permettant d'attribuer un nombre aléatoire différent à chaque patient qui a pu alors être trié et sélectionné.

2.2. Analyse des données statistiques

L'analyse statistique était purement descriptive. La présentation des variables quantitatives, notamment l'âge et la durée de voyage, a été faite sous la forme de paramètres de position (moyenne, médiane, minimum, maximum, premier et troisième quartiles) et de paramètres de dispersion (variance, écart-type, étendue, écart interquartile). Quant aux variables qualitatives, elles ont été décrites en fonction des effectifs et des proportions de chaque modalité de l'échantillon.

Parmi les 425 patients hospitalisés pour un paludisme à *P. falciparum* au HUS, la grande majorité venait du Cameroun (28%) et de la Côte d'Ivoire (16,23%). La proportion de patients revenant d'autres pays d'Afrique était beaucoup plus faible et à peu près similaire (allant des 1 à 6%). En répartissant les échantillons par région, une grande partie des patients provenait d'Afrique Centrale et d'Afrique de l'Ouest, représentant respectivement 48,94% et 47,29% (Figure 36).

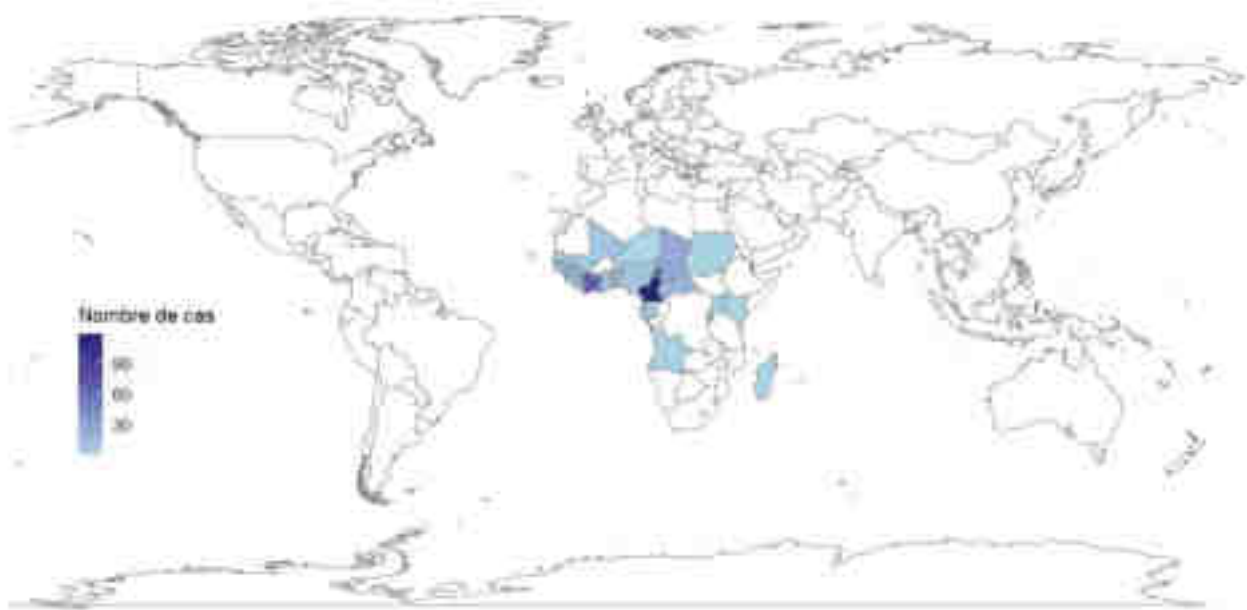


Figure 36 : Représentation graphique de la répartition des cas de paludisme à *P. falciparum* recueillis au HUS entre 2010 et 2022

Selon l'analyse des données statistiques (Tableau 4), deux tiers des patients étaient des hommes et un tiers des femmes. La moyenne d'âge était d'environ 44 ans, avec un écart-type de 16,3 ans. 83% étaient des voyageurs, tandis que 17% étaient des résidents arrivant en France. Environ 37,2% avaient des antécédents de paludisme et plus de la moitié d'entre eux n'avaient pas pris de chimioprophylaxie.

Tableau 5 : Récapitulatif des données statistiques

	EFFECTIFS	PROPORTIONS	INTERVALLE DE CONFIANCE (IC)
SEXE			
Femme	158	37.18	[32.57 ; 41.97]
Homme	267	62.82	[58.03 ; 67.43]
REGION			
Afrique de l'Est	16	3.76	[2.17 ; 6.04]
Afrique centrale	208	48.94	[44.09 ; 53.8]
Afrique de l'Ouest	201	47.29	[42.46 ; 52.16]
ANTECEDENTS DE PALUDISME			
Non	108	25.41	[21.34 ; 29.83]
Ne sait pas	159	37.41	[32.8 ; 42.2]
Oui	158	37.18	[32.57 ; 41.97]
CHIMIOPROPHYLAXIE			
Non	220	51.76	[46.9 ; 56.61]
Ne sait pas	105	24.71	[20.68 ; 29.09]
Oui	100	23.53	[19.58 ; 27.86]

Concernant les patients ayant pris une chimioprophylaxie, plusieurs molécules différentes ont été observées (Figure 37). De manière générale, elle fut assez mal suivie par le patient, décrite par des termes tels que « une mauvaise observance en zone d'endémie » ou encore par « l'arrêt en retour de voyage ». La doxycycline a été la molécule la plus prescrite, avec 32 patients l'ayant prise, parmi lesquels 18 personnes avaient mal suivi le traitement. Vient ensuite la méfloquine, l'atovaquone-proguanil (Malarone®) et la sulfadoxine-pyriméthamine. Il manque cependant un certain nombre de données, avec 33 patients qui avait pris une chimioprophylaxie, mais dont le nom du traitement n'a pas été consigné, ce qui pourrait avoir un impact non négligeable sur l'interprétation de ces résultats. Dans les autres traitements utilisés se trouvaient la chloroquine (Nivaquine®), la chloroquine-proguanil (Savarine®) et la quinine.

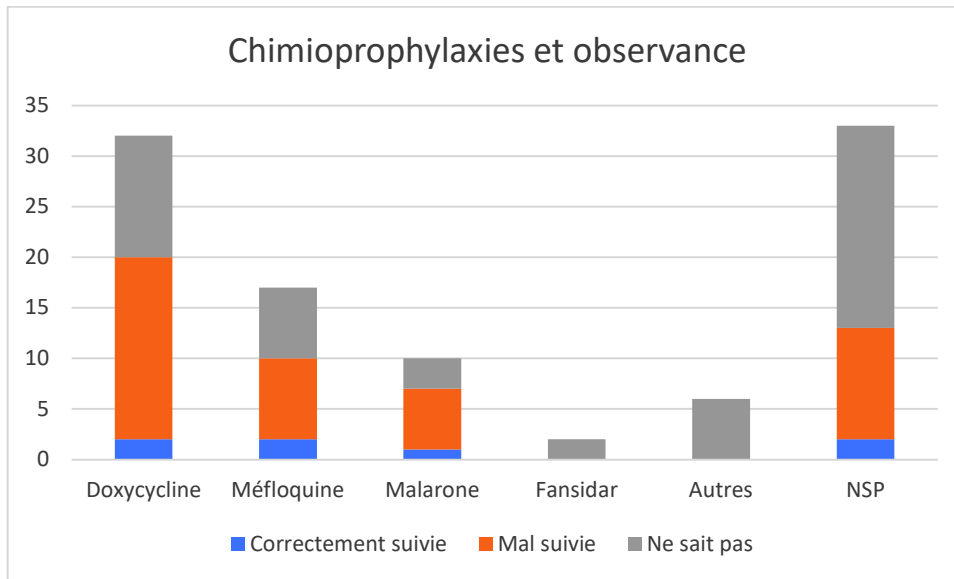


Figure 37 : Chimioprophylaxies rapportées ainsi que leur observance

2.3. Méthodes

2.3.1. Techniques d'amplification des gènes de résistance : TSARA réduit

Afin de faciliter le séquençage et la mise en évidence des différents marqueurs de résistance recherchés, une amplification des gènes d'intérêt est nécessaire. Cette technique consiste en l'enchaînement de plusieurs étapes de PCR et de purifications de l'échantillon (Figure 38). Les étapes de purifications sont essentielles, permettant d'éliminer les excès de nucléotides, les sels, les amorces et les dimères d'amorces.

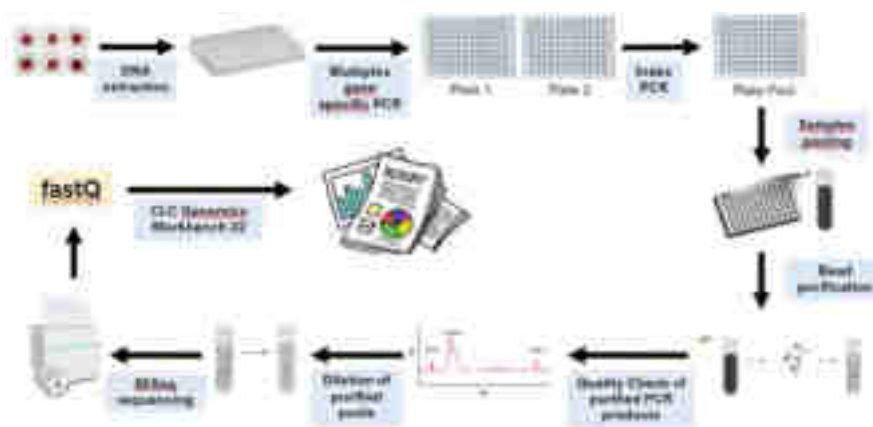


Figure 38 : Schéma résumé du déroulé de la manipulation, comprenant une technique d'amplification des gènes de résistance (TSARA) suivi d'une technique de séquençage du génome

L'ADN du parasite est extrait du sang total afin d'être analysé pour détecter la présence de mutations ponctuelles dans les différents marqueurs cités précédemment :

- Le domaine de l'hélice de *Pfkelch13* (codons 430-720)
- *Pfprt* (codons 72-76, 93, 97, 145, 218, 343, 350, 353 et 356)
- *Pfmdr1* (aux codons 86, 184, 1034, 1042 et 1246)
- *Pfdhfr* (aux codons 16, 50, 51, 59, 108, 164)
- *Pfdhps* (aux codons 431, 436, 437, 540, 581, 613)

Seront recherchés également les délétions dans *Pfhrp2* et *Pfhrp3*.

A la suite des deux étapes d'amplifications, tous les échantillons sont regroupés dans un seul contenant. Afin d'assurer l'interprétabilité des résultats, chaque échantillon est marqué de manière distincte, ce qui permet de les identifier même après le mélange de tous les échantillons.

2.3.2. Séquençage

Le séquençage est réalisé par l'Institut Pasteur, situé à Paris, à l'aide des réactifs MiSeq v2 et de l'automate d'Illumina. Les échantillons sont à cette étape de l'analyse, qui sera ainsi la dernière étape analytique avant l'interprétation des résultats.

CONCLUSION

La présente thèse permet une meilleure compréhension de l'évolution des résistances de *P. falciparum* aux traitements antipaludiques en Afrique subsaharienne. L'analyse approfondie des marqueurs de résistance a permis de mettre en lumière plusieurs choses. Tout d'abord, la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine et la sulfadoxine-pyriméthamine, portée respectivement par les gènes *Pfprt* et par *Pfdhfr* et *Pfdhps* est aujourd'hui bien établie dans les zones endémiques. Nous notons cependant pour la chloroquine qu'une diminution de la résistance a été observée suite à l'arrêt de son utilisation. Les mécanismes de résistances de deux médicaments partenaires recommandés actuellement, la méfloquine et la pipéraquline, ont été démontrés. La résistance à la méfloquine est corrélée à des amplifications du gène *Pfmdr1*. Celle à la pipéraquline est associée à une augmentation du nombre de copies de *Pfpm2/3* et à des mutations de *Pfprt* toutefois différentes de celles observées pour la chloroquine. Ces observations mettent en avant la nécessité d'une surveillance et d'un suivi des marqueurs de résistance pour en garantir l'efficacité dans la lutte contre le paludisme.

L'émergence établie de résistances partielles à l'artémisinine en Afrique subsaharienne suscite une inquiétude particulière. Les mutations *Pfkelch13* identifiées, telles que C469Y, R561H, P574L et R622I, qui ont été validés par l'OMS comme étant responsable d'un allongement de la demi-vie parasitaire, sont des signaux préoccupants. Aucune répercussion n'a pour l'instant été observée *in vivo*, probablement grâce à l'efficacité préservée du médicament partenaire. Le suivi approfondi de ces marqueurs sera essentiel dans les années à venir afin de limiter au maximum la propagation de ces résistances. Dans le cas où de nouvelles résistances émergeraient, des stratégies alternatives sont actuellement envisagées, telles que l'utilisation de nouvelles approches thérapeutiques (TACT, antipaludiques de nouvelles générations) et de prévention (chimio prophylaxie, contrôle du vecteur) ainsi que dans la mise en évidence de nouveaux marqueurs. Elles seront impératives afin de maîtriser au mieux cette émergence et de réduire au maximum l'impact sur la santé des populations concernées.

Les échantillons de patients collectés au CHU de Strasbourg, de 2010 à 2022, permettront une analyse précieuse de la présence des marqueurs sur les gènes de *Pfkelch13*, *Pfprt*, *Pfmdr1*, *Pfdhfr* et *Pfdhps*. Ces travaux constitueraient ainsi une avancée significative dans la lutte contre le paludisme, soulignant l'importance cruciale de la recherche continue pour faire face à l'évolution constante de cette menace pour la santé publique mondiale.

ANNEXE

Annexe 1 : Mutations non-synonymes retrouvées en Afrique et en Asie du Sud-Est (3,50,53). Les mutations en gras sont associées à une demi-vie de clairance parasitaire ≥ 5 h et ceux en italique à des mutations associées à un RSA $>1\%$

Numéro d'hélice	Asie du Sud-Est		Afrique		Asie du Sud-Est + Afrique
1	P441L	N458I	G449S		<i>F446I</i>
	P443S	C469F	G449D		S459L
	G449A	T474I	V454I		<i>C469Y</i>
	D452E		L463S		
	<i>N458Y</i>		I465T		
2	<i>M476I</i>	F495L	T478P		<i>Y493H</i>
	K479I	G496F	V487I		S522C
	A481V	T508N	V494I		
	F483S	Y511M	N499D		
	S485N	R515T	D501G		
	N490T	D516Y	V520I		
	L492S	N525D	V520A		
3	R528T	R561C	C532S	A557S	P527H
	G533A	V568G	V534L	N554D	N537I
	G533S		V534I	Y558H	<i>P553L</i>
	G538V		C542Y	V566I	<i>R561H</i>
	<i>R539T</i>		G544R	A569T	
	<i>I543T</i>		G545E	T573S	
	E556D		G548S		
4	<i>P574L</i>		R575G	G595S	A578S
	R575K		S576L	M608L	M579I
	D584V		V581F	E612D	<i>C580Y</i>
			D584N	Q613L	Q613E
			V589I		
5	F614L		A617T	V637I	<i>R622I</i>
	A621F		A617V	V637A	Y630F
	S623C		L619S	V637D	
			A626P	G638R	
			A626T	G639V	
			N629Y		
6	P667A		V666A		<i>A675V</i>
	P667L		D680N		A676S
	F673I				H719N
	A676D				

BIBLIOGRAPHIE

1. Plucinski M, Aidoo M, Rogier E. Laboratory Detection of Malaria Antigens: a Strong Tool for Malaria Research, Diagnosis, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev.* 16 juin 2021;34(3):e0025020.
2. Ross R. The True Nature of the Plasmodium and of Some Other Parasitic Appearances in Blood. *Indian Med Gaz.* oct 1893;28(10):329-36.
3. OMS. World malaria report 2022 [Internet]. 2022 [cité 13 avr 2023]. Disponible sur: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2022>
4. Malaria Atlas Project [Internet]. Taux mondial de *P. falciparum* : Prévalence de *P. falciparum*, en 2020, chez les enfants entre 2 et 10 ans. Disponible sur: https://data.malariaatlas.org/maps?layers=Malaria:202206_Global_Pf_Parasite_Rate
5. Barber BE, Grigg MJ, Cooper DJ, van Schalkwyk DA, William T, Rajahram GS, et al. Clinical management of Plasmodium knowlesi malaria. *Adv Parasitol.* 2021;113:45-76.
6. Milner DA. Malaria Pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* janv 2018;8(1):a025569.
7. Greenwood B, Mutabingwa T. Malaria in 2002. *Nature.* 7 févr 2002;415(6872):670-2.
8. OMS. Stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme 2016-2030 [Internet]. [cité 27 juin 2023]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/publications-detail/9789241564991>
9. SPF. Bulletin épidémiologique hebdomadaire, 2 juin 2022, n°Hors-série Recommandations sanitaires pour les voyageurs, 2022 (à l'attention des professionnels de santé) [Internet]. [cité 27 juin 2023]. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/import/bulletin-epidemiologique-hebdomadaire-2-juin-2022-n-hors-serie-recommandations-sanitaires-pour-les-voyageurs-2022-a-l-attention-des-professionn>
10. Carnevale P, Robert V, éditeurs. Les anophèles: Biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle [Internet]. IRD Éditions; 2009 [cité 19 août 2023]. Disponible sur: <http://books.openedition.org/irdeditions/10374>
11. OMS. Lignes directrices de l'OMS pour le paludisme [Internet]. 2023 mars. Report No.: WHO/UCN/GMP/2023.01. Disponible sur: <https://www.who.int/publications/i/item/guidelines-for-malaria>

12. Kientega M, Kranjc N, Traoré N, Kaboré H, Soma DD, Morianou I, et al. Analysis of the Genetic Variation of the Fruitless Gene within the *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) Complex Populations in Africa. *Insects*. 13 nov 2022;13(11):1048.
13. Coetzee M, Craig M, le Sueur D. Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. *Parasitol Today Pers Ed*. févr 2000;16(2):74-7.
14. Kibret S, Wilson GG, Ryder D, Tekie H, Petros B. The Influence of Dams on Malaria Transmission in Sub-Saharan Africa. *EcoHealth*. juin 2017;14(2):408-19.
15. Hamid-Adiamoh M, Jabang AMJ, Opondo KO, Ndiath MO, Assogba BS, Amambua-Ngwa A. Distribution of *Anopheles gambiae* thioester-containing protein 1 alleles along malaria transmission gradients in The Gambia. *Malar J*. 10 mars 2023;22(1):89.
16. Mnzava A, Monroe AC, Okumu F. *Anopheles stephensi* in Africa requires a more integrated response. *Malar J*. 31 mai 2022;21:156.
17. Takken W, Lindsay S. Increased Threat of Urban Malaria from *Anopheles stephensi* Mosquitoes, Africa. *Emerg Infect Dis*. juill 2019;25(7):1431-3.
18. OMS. Espèces vectorielles invasives : *Anopheles stephensi* [Internet]. Malaria Map Threat; Disponible sur: <https://apps.who.int/malaria/maps/threats/>
19. Haldar K, Bhattacharjee S, Safeukui I. Drug resistance in *Plasmodium*. *Nat Rev Microbiol*. mars 2018;16(3):156-70.
20. Ross LS, Fidock DA. Elucidating Mechanisms of Drug-Resistant *Plasmodium falciparum*. *Cell Host Microbe*. 10 juill 2019;26(1):35-47.
21. Neveu N. Une complication majeure du paludisme : le neuropaludisme [Internet]. *Sciences pharmaceutiques*; 2017. Disponible sur: <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01557440/document>
22. Jensen AR, Adams Y, Hviid L. Cerebral *Plasmodium falciparum* malaria: The role of PfEMP1 in its pathogenesis and immunity, and PfEMP1-based vaccines to prevent it. *Immunol Rev*. janv 2020;293(1):230-52.
23. Bouchaud O. Prise en charge et prévention du paludisme d'importation [Internet]. 2017. Disponible sur: <https://www.infectiologie.com/UserFiles/File/spilf/recos/2017-palu-texte-final.pdf>

24. De Koninck AS, Cnops L, Hofmans M, Jacobs J, Van den Bossche D, Philippé J. Diagnostic performance of the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based illumigene® malaria assay in a non-endemic region. *Malar J*. 17 oct 2017;16(1):418.
25. Moody A. Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. *Clin Microbiol Rev*. janv 2002;15(1):66-78.
26. Sanner A. L'artémisinine et ses dérivés: apports de la médecine traditionnelle chinoise dans la lutte contre le paludisme chimiorésistant et perspectives contemporaines [Internet]. Sciences du Vivant, Nancy; 2008. Disponible sur: <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732167>
27. MARFING E. Reactif PALUTOP +4 OPTIMA - BIOSYNEX [Internet]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/uploads/2021/04/23/mes-190321-reactifpalutop-biosynex.pdf>
28. OMS. Délétions du gène pfhrp2/3 [Internet]. Disponible sur: <https://apps.who.int/malaria/maps/threats/>
29. Tripathi H, Bhalerao P, Singh S, Arya H, Alotaibi BS, Rashid S, et al. Malaria therapeutics: are we close enough? *Parasit Vectors*. 14 avr 2023;16(1):130.
30. Antimalarial Agents. In: *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury* [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012 [cité 7 août 2023]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548220/>
31. Okombo J, Ohuma E, Picot S, Nzila A. Update on genetic markers of quinine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. juin 2011;177(2):77-82.
32. Gao P, Liu YQ, Xiao W, Xia F, Chen JY, Gu LW, et al. Identification of antimalarial targets of chloroquine by a combined deconvolution strategy of ABPP and MS-CETSA. *Mil Med Res*. 14 juin 2022;9(1):30.
33. Ma N, Zhang Z, Liao F, Jiang T, Tu Y. The birth of artemisinin. *Pharmacol Ther*. déc 2020;216:107658.
34. Packard RM. The Origins of Antimalarial-Drug Resistance. *N Engl J Med*. 31 juill 2014;371(5):397-9.
35. Palmer KJ, Holliday SM, Brogden RN. Mefloquine. A review of its antimalarial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs*. mars 1993;45(3):430-75.

36. Menard D, Dondorp A. Antimalarial Drug Resistance: A Threat to Malaria Elimination. *Cold Spring Harb Perspect Med.* juill 2017;7(7):a025619.
37. Hanboonkunupakarn B, White NJ. Advances and roadblocks in the treatment of malaria. *Br J Clin Pharmacol.* févr 2022;88(2):374-82.
38. OMS. Utilisation de l'artésunate-pyronaridine pour le traitement du paludisme non compliqué [Internet]. 2019. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/publications-detail/WHO-HTM-GMP-2019.13>
39. Martino E, Tarantino M, Bergamini M, Castelluccio V, Coricello A, Falcicchio M, et al. Artemisinin and its derivatives; ancient tradition inspiring the latest therapeutic approaches against malaria. *Future Med Chem.* juin 2019;11(12):1443-59.
40. Abdul-Ghani R, Farag HF, Allam AF. Sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*: A zoomed image at the molecular level within a geographic context. *Acta Trop.* 1 févr 2013;125(2):163-90.
41. Lane KD, Mu J, Lu J, Windle ST, Liu A, Sun PD, et al. Selection of *Plasmodium falciparum* cytochrome B mutants by putative PfNDH2 inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12 juin 2018;115(24):6285-90.
42. Mita T, Tanabe K, Kita K. Spread and evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance. *Parasitol Int.* 1 sept 2009;58(3):201-9.
43. Zhao L, Pi L, Qin Y, Lu Y, Zeng W, Xiang Z, et al. Widespread resistance mutations to sulfadoxine-pyrimethamine in malaria parasites imported to China from Central and Western Africa. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 29 nov 2019;12:1-6.
44. Srivastava IK, Morrissey JM, Darrouzet E, Daldal F, Vaidya AB. Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome b in malaria parasites. *Mol Microbiol.* août 1999;33(4):704-11.
45. Yao Y, Guo Q, Cao Y, Qiu Y, Tan R, Yu Z, et al. Artemisinin derivatives inactivate cancer-associated fibroblasts through suppressing TGF- β signaling in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res CR.* 26 nov 2018;37(1):282.
46. Klayman DL. *Qinghaosu* (Artemisinin): an Antimalarial Drug from China. *Science.* 31 mai 1985;228(4703):1049-55.

47. Stokes BH, Dhingra SK, Rubiano K, Mok S, Straimer J, Gnädig NF, et al. Plasmodium falciparum K13 mutations in Africa and Asia impact artemisinin resistance and parasite fitness. eLife. 19 juill 2021;10:e66277.
48. Ward KE, Fidock DA, Bridgford JL. Plasmodium falciparum resistance to artemisinin-based combination therapies. Curr Opin Microbiol. oct 2022;69:102193.
49. Xie SC, Ralph SA, Tilley L. K13, the Cytostome, and Artemisinin Resistance. Trends Parasitol. juin 2020;36(6):533-44.
50. Fairhurst RM. Understanding artemisinin-resistant malaria: what a difference a year makes. Curr Opin Infect Dis. oct 2015;28(5):417-25.
51. OMS. Strategy to respond to antimalarial drug resistance in Africa. 2022.
52. Ménard D, Ariey F, Mercereau-Puijalon O. Étude de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques au sein du réseau international des Instituts Pasteur (RIIP-Palu). médecine/sciences. juin 2013;29(6-7):647-55.
53. OMS. Report on antimalarial drug efficacy, resistance, and response [Internet]. 2020. Report No.: ISBN 978-92-4-001281-3. Disponible sur: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240012813>
54. Kassaza K, Long AC, McDaniels JM, Andre M, Fredrickson W, Nyehangane D, et al. Surveillance of Plasmodium falciparum pfcrt haplotypes in southwestern Uganda by high-resolution melt analysis. Malar J. 25 févr 2021;20(1):114.
55. Fançonny C, Brito M, Gil JP. Plasmodium falciparum drug resistance in Angola. Malar J. 9 févr 2016;15(1):74.
56. Price RN, Uhlemann AC, Brockman A, McGready R, Ashley E, Phaipun L, et al. Mefloquine resistance in Plasmodium falciparum and increased pfmdr1 gene copy number. Lancet Lond Engl. 31 août 2004;364(9432):438-47.
57. Veiga MI, Dhingra SK, Henrich PP, Straimer J, Gnädig N, Uhlemann AC, et al. Globally prevalent PfMDR1 mutations modulate Plasmodium falciparum susceptibility to artemisinin-based combination therapies. Nat Commun. 18 mai 2016;7:11553.
58. Nzila A, Okombo J, Ohuma E, Al-Thukair A. Update on the in vivo tolerance and in vitro reduced susceptibility to the antimalarial lumefantrine. J Antimicrob Chemother. oct 2012;67(10):2309-15.

59. Amato R, Lim P, Miotto O, Amaratunga C, Dek D, Pearson RD, et al. Genetic markers associated with dihydroartemisinin-piperaquine failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a genotype-phenotype association study. *Lancet Infect Dis.* févr 2017;17(2):164-73.
60. Rahmasari FV, Asih PBS, Rozi IE, Wangsamuda S, Risandi R, Dewayanti FK, et al. Evolution of genetic markers for drug resistance after the introduction of dihydroartemisinin-piperaquine as first-line anti-malarial treatment for uncomplicated *falciparum* malaria in Indonesia. *Malar J.* 9 août 2023;22(1):231.
61. Sisowath C, Ferreira PE, Bustamante LY, Dahlström S, Mårtensson A, Björkman A, et al. The role of *pfmdr1* in *Plasmodium falciparum* tolerance to artemether-lumefantrine in Africa. *Trop Med Int Health TM IH.* juin 2007;12(6):736-42.
62. Xu C, Wei Q, Yin K, Sun H, Li J, Xiao T, et al. Surveillance of Antimalarial Resistance *Pfcr*, *Pfmdr1*, and *Pfkelch13* Polymorphisms in African *Plasmodium falciparum* imported to Shandong Province, China. *Sci Rep.* 28 août 2018;8(1):12951.
63. Ehrlich HY, Jones J, Parikh S. Molecular surveillance of antimalarial partner drug resistance in sub-Saharan Africa: a spatial-temporal evidence mapping study. *Lancet Microbe.* sept 2020;1(5):e209-17.
64. Moyeh MN, Njimoh DL, Evehe MS, Ali IM, Nji AM, Nkafu DN, et al. Effects of Drug Policy Changes on Evolution of Molecular Markers of *Plasmodium falciparum* Resistance to Chloroquine, Amodiaquine, and Sulphadoxine-Pyrimethamine in the South West Region of Cameroon. *Malar Res Treat.* 2018;2018:7071383.
65. She D, Wang Z, Liang Q, Lu L, Huang Y, Zhang K, et al. Polymorphisms of *pfcr*, *pfmdr1*, and *K13-propeller* genes in imported *falciparum* malaria isolates from Africa in Guizhou province, China. *BMC Infect Dis.* 16 juill 2020;20(1):513.
66. Zhao W, Li X, Yang Q, Zhou L, Duan M, Pan M, et al. In vitro susceptibility profile of *Plasmodium falciparum* clinical isolates from Ghana to antimalarial drugs and polymorphisms in resistance markers. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:1015957.
67. Witkowski B, Nicolau ML, Soh PN, Iriart X, Menard S, Alvarez M, et al. *Plasmodium falciparum* isolates with increased *pfmdr1* copy number circulate in West Africa. *Antimicrob Agents Chemother.* juill 2010;54(7):3049-51.

68. Yan H, Feng J, Yin JH, Huang F, Kong XL, Lin KM, et al. High Frequency Mutations in *pfdhfr* and *pfdhps* of *Plasmodium falciparum* in Response to Sulfadoxine-Pyrimethamine: A Cross-Sectional Survey in Returning Chinese Migrants From Africa. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:673194.
69. Wang X, Zhang X, Chen H, Lu Q, Ruan W, Chen Z. Molecular Determinants of Sulfadoxine-Pyrimethamine Resistance in *Plasmodium falciparum* Isolates from Central Africa between 2016 and 2021: Wide Geographic Spread of Highly Mutated *Pfdhfr* and *Pfdhps* Alleles. *Microbiol Spectr.* 26 oct 2022;10(5):e0200522.
70. Naidoo I, Roper C. Mapping « partially resistant », « fully resistant », and « super resistant » malaria. *Trends Parasitol.* oct 2013;29(10):505-15.
71. Flegg JA, Humphreys GS, Montanez B, Strickland T, Jacome-Meza ZJ, Barnes KI, et al. Spatiotemporal spread of *Plasmodium falciparum* mutations for resistance to sulfadoxine-pyrimethamine across Africa, 1990-2020. *PLoS Comput Biol.* août 2022;18(8):e1010317.
72. Fairhurst RM, Dondorp AM. Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* Malaria. *Microbiol Spectr.* juin 2016;4(3).
73. WWARN K13 Genotype-Phenotype Study Group. Association of mutations in the *Plasmodium falciparum* Kelch13 gene (Pf3D7_1343700) with parasite clearance rates after artemisinin-based treatments-a WWARN individual patient data meta-analysis. *BMC Med.* 17 janv 2019;17(1):1.
74. Birnbaum J, Scharf S, Schmidt S, Jonscher E, Hoeijmakers WAM, Flemming S, et al. A Kelch13-defined endocytosis pathway mediates artemisinin resistance in malaria parasites. *Science.* 3 janv 2020;367(6473):51-9.
75. Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois AC, Khim N, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature.* 2 janv 2014;505(7481):50-5.
76. OMS. Artemisinin resistance and artemisinin-based combination therapy efficacy [Internet]. 2019. Disponible sur: <https://www.who.int/docs/default-source/documents/publications/gmp/who-cds-gmp-2019-17-eng.pdf?ua=1%20en%20francais>
77. Taylor SM, Parobek CM, DeConti DK, Kayentao K, Coulibaly SO, Greenwood BM, et al. Absence of putative artemisinin resistance mutations among *Plasmodium falciparum* in Sub-Saharan Africa: a molecular epidemiologic study. *J Infect Dis.* 1 mars 2015;211(5):680-8.

78. Fidock DA, Rosenthal PJ. Artemisinin resistance in Africa: How urgent is the threat? *Med N Y N*. 10 déc 2021;2(12):1287-8.
79. Balikagala B, Fukuda N, Ikeda M, Katuru OT, Tachibana SI, Yamauchi M, et al. Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Africa. *N Engl J Med*. 23 sept 2021;385(13):1163-71.
80. Mihreteab S, Platon L, Berhane A, Stokes BH, Warsame M, Campagne P, et al. Increasing Prevalence of Artemisinin-Resistant HRP2-Negative Malaria in Eritrea. *N Engl J Med*. 28 sept 2023;389(13):1191-202.
81. van der Pluijm RW, Tripura R, Hoglund RM, Pyae Phyo A, Lek D, Ul Islam A, et al. Triple artemisinin-based combination therapies versus artemisinin-based combination therapies for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: a multicentre, open-label, randomised clinical trial. *Lancet Lond Engl*. 25 avr 2020;395(10233):1345-60.
82. Ashley EA, Phyo AP. Drugs in Development for Malaria. *Drugs*. juin 2018;78(9):861-79.
83. Barber BE, Fernandez M, Patel HB, Barcelo C, Woolley SD, Patel H, et al. Safety, pharmacokinetics, and antimalarial activity of the novel triaminopyrimidine ZY-19489: a first-in-human, randomised, placebo-controlled, double-blind, single ascending dose study, pilot food-effect study, and volunteer infection study. *Lancet Infect Dis*. juin 2022;22(6):879-90.
84. Alaithan H, Kumar N, Islam MZ, Liappis AP, Nava VE. Novel Therapeutics for Malaria. *Pharmaceutics*. 23 juin 2023;15(7):1800.
85. Phillips MA, Rathod PK. Plasmodium dihydroorotate dehydrogenase: a promising target for novel anti-malarial chemotherapy. *Infect Disord Drug Targets*. juin 2010;10(3):226-39.
86. McCarthy JS, Yalkinoglu Ö, Odedra A, Webster R, Oeuvray C, Tappert A, et al. Safety, pharmacokinetics, and antimalarial activity of the novel plasmodium eukaryotic translation elongation factor 2 inhibitor M5717: a first-in-human, randomised, placebo-controlled, double-blind, single ascending dose study and volunteer infection study. *Lancet Infect Dis*. déc 2021;21(12):1713-24.
87. Radohery GFR, Gower J, Barber BE, Kansagra K, Möhrle JJ, Davenport MP, et al. Effect of novel antimalarial ZY-19489 on *Plasmodium falciparum* viability in a volunteer infection study. *Lancet Infect Dis*. juin 2022;22(6):760-1.
88. Zagórska A, Jaromin A. Antimalarials Targeting the Malaria Parasite Cation ATPase P. *falciparum* ATP4 (PfATP4). *Curr Top Med Chem*. 2023;23(3):214-26.

89. Spillman NJ, Kirk K. The malaria parasite cation ATPase PfATP4 and its role in the mechanism of action of a new arsenal of antimalarial drugs. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* déc 2015;5(3):149-62.
90. Laleu B, Rubiano K, Yeo T, Hallyburton I, Anderson M, Crespo-Fernandez B, et al. Exploring a Tetrahydroquinoline Antimalarial Hit from the Medicines for Malaria Pathogen Box and Identification of its Mode of Resistance as PfeEF2. *ChemMedChem.* 18 nov 2022;17(22):e202200393.
91. Ross LS, Gamo FJ, Lafuente-Monasterio MJ, Singh OMP, Rowland P, Wiegand RC, et al. In vitro resistance selections for *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase inhibitors give mutants with multiple point mutations in the drug-binding site and altered growth. *J Biol Chem.* 27 juin 2014;289(26):17980-95.
92. Biaou COA, Kpozehouen A, Glèlè-Ahanhanzo Y, Ayivi-Vinz G, Ouro-Koura AR, Azandjémé C. [Sulfadoxine-pyrimethamine-based intermittent preventive treatment in pregnant women and its effect on birth weight: application of 3-dosing regimen in the urban area of South Benin in 2017]. *Pan Afr Med J.* 2019;34:155.
93. Dattoo MS, Natama HM, Somé A, Bellamy D, Traoré O, Rouamba T, et al. Efficacy and immunogenicity of R21/Matrix-M vaccine against clinical malaria after 2 years' follow-up in children in Burkina Faso: a phase 1/2b randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis.* déc 2022;22(12):1728-36.
94. OMS. Conseils actualisés en matière de vaccination : l'OMS recommande le vaccin R21/Matrix-M pour prévenir le paludisme [Internet]. 2023. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news/item/02-10-2023-who-recommends-r21-matrix-m-vaccine-for-malaria-prevention-in-updated-advice-on-immunization>
95. Aguirre-Botero MC, Wang LT, Formaglio P, Aliprandini E, Thiberge JM, Schön A, et al. Cytotoxicity of human antibodies targeting the circumsporozoite protein is amplified by 3D substrate and correlates with protection. *Cell Rep.* juill 2023;42(7):112681.
96. Bouron JB. *Géoconfluences.* 2017 [cité 16 juin 2023]. L'atlas du dossier « Afriques(s) : dynamiques régionales ». Disponible sur: <http://geoconfluences.ens-lyon.fr/informations-scientifiques/dossiers-regionaux/afrique-dynamiques-regionales/ressources-classees/atlas>

FICHE SIGNALÉTIQUE

NOM : TOURTITE

Prénom : Chaïmae

Né(e) le 04/12/1997 à Liège (Belgique)

ÉVALUATION DE L'ÉVOLUTION DES RÉSISTANCES DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* AUX TRAITEMENTS ANTIPALUDIQUES EN AFRIQUE SUBSAHARIENNE

Date et lieu de la soutenance : 23/10/2023 à la salle 210 du forum de la Faculté de Médecine

N° d'ordre : _____

RESUME

Cette thèse analyse les résistances de *Plasmodium falciparum* en Afrique subsaharienne, mettant en avant la mise en évidence d'une résistance partielle à l'artémisinine *in vitro*, particulièrement préoccupante sur le continent. Les résistances à la chloroquine, à la sulfadoxine-pyriméthamine, à la méfloquine ainsi qu'à la pipéraquline sont également examinées, avec des marqueurs identifiés. La recherche de nouveaux marqueurs est soulignée. Bien que la résistance aux artémisinines soit établie en Asie du Sud-Est, seuls quelques marqueurs ont été rapportés en Afrique sans preuve de résistance *in vivo*. Des travaux ultérieurs aborderont les résistances chez les patients hospitalisés entre 2010 et 2022 en Afrique subsaharienne.

This thesis examines *Plasmodium falciparum* resistance in sub-Saharan Africa, emphasizing the identification of partial artemisinin resistance *in vitro*, which is particularly concerning on the continent. Resistances to chloroquine, sulfadoxine-pyrimethamine, mefloquine, and piperazine are also explored, with markers identified. The search for new markers is underscored. While artemisinin resistance is established in Southeast Asia, only a few markers have been reported in Africa without *in vivo* resistance demonstrated. Subsequent work will address resistance in hospitalized patients between 2010 and 2022 in sub-Saharan Africa.

Mots clés

Plasmodium falciparum ; Antipaludiques ; Résistance ; Paludisme ; Afrique subsaharienne ; *Pfkelch13*

Nom du Directeur de Thèse : BRUNET Julie