

REPUBLIQUE DE COTE-D'IVOIRE
UNION-DISCIPLINE-TRAVAIL

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
DE LA RECHERCHE ET DE L'INNOVATION
TECHNOLOGIQUE

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES



ANNEE UNIVERSITAIRE 1996-1997

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N° d'ordre. 258/97

THESE
présentée pour
**L'OBTENTION DU DOCTORAT DE 3^è CYCLE
DE SCIENCES BIOLOGIQUES**

Spécialité :

PHARMACOLOGIE DES SUBSTANCES NATURELLES ANTIPALUDIQUES

Par

DJAMAN A. JOSEPH

Thème :

**EVALUATION D'UNE ACTION ANTIPLASMODIALE
DE OLAX SUBSCORPIOIDES Oliv. (OLACACEE)
CONTRE DES SOUCHES CHLOROQUINORESISTANTES
DE PLASMODIUM FALCIPARUM**

Soutenue publiquement à Abidjan, le 16 JUILLET 1997 devant le Jury composé de :

Président :	Monsieur GUEDE-GUINA F.	Professeur Titulaire
Examineurs :	Monsieur KONE. Penahouré P.	Maître de Conférence
	Monsieur ASSOUMOU Aka	Professeur Agrégé

DEDICACE

A MES CHERS PARENTS,

vous qui n'avez pas pu voir la fin de l'acte que vous avez posé en m'ouvrant la voie à l'instruction.

A MON GRAND-FRERE , Mr DJAMAN SOA

Toi qui as si brillamment assuré la relève des parents

A MON PETIT FRERE ET A MES SOEURS,

Merci d'avoir patienté tout en me soutenant

A MON TUTEUR, Mr MAUSSO G. BERNARD

Reçois ce document comme venant d'un de tes fils.

A MON EPOUSE, Mme DJAMAN MHAN,

Merci mon Amour pour ta patience et ton soutien et reçois ce modeste document.

AVANT PROPOS

Ce travail a été réalisé d'une part au laboratoire de **Pharmacodynamie biochimique** de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université de Cocody et d'autre part au laboratoire de **Microbiologie** de l'Institut National de Santé Publique (I.N.S.P) d'Adjamé. Les prélèvements de sang de malades suspectés de paludisme ont été effectués au C.H.U de Yopougon, au Centre médical AMI à Cocody et à l'I.N.S.P. Les laboratoires de parasitologie de ces différentes formations sanitaires ont été utilisés pour le diagnostic parasitologie (goutte épaisse, frottis sanguin et quantitative buffy coat) du paludisme chez ces malades.

Au terme de ces trois années de recherche, il importe d'exprimer toute ma reconnaissance à tous ceux qui ont d'une manière ou d'une autre contribués à la réalisation de ce travail.

Je tiens tout particulièrement à exprimer ma reconnaissance à mon Directeur de Thèse: le Professeur **F. GUEDE-GUINA** Professeur titulaire de Biochimie et de Pharmacodynamie biochimique à la F.A.S.T de l'Université de Cocody, pour l'intérêt tout particulier qu'il accorde à ce programme de substances antipaludiques. Cher Professeur, vous avez

démontré par votre disponibilité que ce travail vous tenait scientifiquement à coeur. Vous étiez en effet disposé, malgré votre emploi de temps très chargé à le suivre personnellement dans les moindres détails. Au cours de ces années, j'ai particulièrement apprécié la confiance que vous m'avez faite et cela m'a responsabilisé davantage. Veuillez trouver en ces quelques lignes, le sentiment d'un Etudiant heureux et satisfait de son Directeur de Thèse.

A mon Encadreur Technique : le **Docteur Marcellin K. DJE** Maître Assistant de Biochimie à la faculté des Sciences de l'Environnement de l'Université d'ABOBO-ADJAME, n'a pas hésité depuis 1993 à me suivre et à m'initier à la recherche. Je lui exprime toute ma gratitude ; Cher Maître, vous avez été très proche de moi et avez su me donner les directives nécessaires afin de présenter ce travail. Croyez-moi, j'ai tout au long de celui-ci essayé de réfléter votre esprit de recherche. Aussi voudrais-je vous rassurer quant à ma franche collaboration pour le futur.

Travailler sur un tel sujet sans demander le soutien et la collaboration de praticiens spécialistes, ne peut que gêner un biologiste qui travaille sur un problème de santé publique. C'est pourquoi, je suis particulièrement heureux d'adresser au **Docteur Noelle A. SANGARE** Pharmacien Biologiste, Chef de service du Laboratoire de microbiologie

de l'INSP, mes remerciements et à travers elle, saluer l'excellente hospitalité du **Professeur R.J. C. DELAFOSSE**, Directeur de l'INSP.

Chère ainée , merci pour les mains grandement ouvertes que vous m'avez tendues, en mettant à ma disposition une partie de votre Laboratoire, du Matériel et surtout les conseils appropriés afin que ce travail puisse connaître un heureux dénouement. Les mots me manquent pour qualifier votre disponibilité et vos encouragements durant nos quatre années de collaboration. J'aimerais associer à ces remerciements le personnel de votre Laboratoire, je veux parler du **Docteur Marie-Thèrese KOUASSI**, de **MM** Noël AHINGORA, Kouadio ANOH, Lamine KONE, Aké CHOHO et **Mlle** Clémence KOUYATE.

Je remercie également les autres formations sanitaires qui ont accepté que des prélèvements de sang de malades atteints de paludisme soient effectués en leur sein,

- les Médecins, infirmiers et filles de salle de la collectivité de l'INSP,

- le Laboratoire de parasitologie du CHU de Yopougon dirigé par le **Professeur A. ASSOUMOU** que je remercie particulièrement , ainsi que les techniciens de ce laboratoire : **MM**, M. N'CHO, KODIA, DOUMOUYA,

- et le centre Médical Ami dirigé par **Professeur Pedro E.**

BORGES

A l'endroit des enseignants du Département de Biochimie qui m'ont formé, je témoigne toute ma reconnaissance ; notamment

- au **Professeur Jacques K. DIPOH** doyen honoraire de la FAST,

- au **Docteur François A. YEBOUA** pour ses conseils pratiques, chaque fois que je suis allé vers lui.

A tous les chercheurs du Laboratoire de Pharmacodynamie-biochimique, j'exprime mes remerciements, surtout au **Docteur VANGAH-MANDA** pour sa disponibilité à m'aider pour la Bibliographie. Chère grande soeur vous n'avez pas hésité à me donner des documents et à me consacrer du temps pour parfaire ce travail. Je remercie aussi les **Docteurs M. BONGA** et **A. YAPO** pour leurs conseils.

A toute l'équipe de recherche du centre Muraz de BOBO-DIOUALASSO, je dis merci pour le Matériel qu'ils ont mis à ma disposition pour terminer ce travail. Je témoigne ma sympathie au **Docteur J.B. OUEDRAGO.**

Merci aux Docteurs C. ADJETTEY, J. HOUNDETE et Mr SANOGO pour leur collaboration efficace aux *Cultures in vitro*.

Enfin mes remerciements à tous ceux qui m'ont soutenu matériellement et moralement, le Professeur Sévérin AKE Chef de Département de Biologie et Physiologie Végétale, et le Docteur Félix GNANGBE.

Merci à Mr et Mme TSIMI, pour leur soutien matériel et l'intérêt qu'ils ont attaché à ce travail.

Chère Marie BOLOU, merci pour avoir accepté de dactylographier ce travail et d'avoir sorti un texte d'une telle qualité.

LA LISTE DES ABBREVIATIONS

% :	pour cent
°C :	degré Celsius
µg/ml :	microgramme par millilitre
µl :	microlitre
ACD :	Acide citrique dextrose
AEI :	activity enhancement index
amp.:	Ampoule
CI ₉₀ :	concentration pour 90 % d'inhibition
CI ₅₀ :	concentration pour 50 % d'inhibition de la maturation du <i>Plasmodium</i>
CO ₂ :	gaz carbonique
CQR :	Chloroquinorésistant
CQS :	Chloroquinosensible
DP :	densité parasitaire
EDTA :	éthylène diamine tétraacétate
Fig. :	Figure
grp :	globules rouges parasités
HEPES :	acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonic
IS :	isolat
kda :	kilodalton
kg :	Kilogramme
mg :	milligramme
mg/kg :	milligramme par kilogramme

min. : minute

ml : millilitre

mm³ : millimètre cube

nM : nanomolaire

O.M.S : Organisation Mondiale de la santé

OLSU : Olax subscorpioïdes, Oliv.

P. : *Plasmodium*

pH : potentiel hydrogène

Q.B.C : Quantitative Buffy Coat

RPMI : Roosevelt park medium institute

RPS : RPMI + 10% de Sérum humain

tours/min : tours par minute

tpf : trophozoïte

tpf/mm³ : trophozoïte par millimètre cube

SOMMAIRE

<u>LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES</u>	1
I - <u>INTRODUCTION</u>	3
1- LE PALUDISME	5
1-1 EPIDEMIOLOGIE	6
1-2 SIGNES CLINIQUES ET DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE	7
1-2.1 <u>Signes cliniques</u>	7
1-2.2 <u>Diagnostic biologique</u>	9
1-3 TRAITEMENT ET PREVENTION	10
1-3.1 <u>Traitement</u>	10
1-3.2 <u>Prévention</u>	13
1-4 PHYSIOPATHOLOGIE DU PALUDISME	16
2- LES ANTIPALUDIQUES	18

2-1 LES ANTIPALUDIQUES NATURELLES	19
2-1.1 <u>Les alcaloïdes du quinquina</u>	19
2-1.2 <u>L'artémisinine</u>	20
2-2 LES ANTIPALUDIQUES DE SYNTHÈSE	20
2-2.1 Dérivés de la quinine	20
2-2.2 Les Aryl-amino-alcool	22
2-2.3 Les Antifoliques et Antifoliniques	23
2-3 MODE D'ACTION DES ANTIPALUDIQUES	24
2-3.1 <u>Les Schizonticides intraérythrocytaires</u>	24
2-3.2 <u>Les Schizonticides intrahépatiques</u>	25
2-3.3 <u>Les Gamétocytocides</u>	25
2-3.4 <u>Les Sporontocides</u>	25
3- LA CHIMIORESISTANCE DU PALUDISME	26
3-1 DEFINITION ET MESURE DE LA CHIMIORESISTANCE	26
3-1.1 <u>Définition</u>	26
3-1.2 <u>Mesure</u>	26

3-1.3	<u>Mécanismes de résistance aux Amino-4-quinoléines</u>	28
3-2	BASES MOLECULAIRES DE LA CHIMIORESISTANCE	30
3-2.1	<u>La chloroquinorésistance</u>	30
3-2.2	<u>La résistance aux antifoliniques et aux antifoliques</u>	31
3-3	POTENTIALISATION DES ANTIPALUDIQUES	32
3-3.1	<u>Définition</u>	32
3-3.2	<u>Potentialisation de la chloroquine</u>	33
4	OBJECTIF DU TRAVAIL	33
II	<u>MATERIELS ET METHODES</u>	36
1	MATERIELS	37
1-1	MATERIELS BIOLOGIQUES	37
1-1.1	<u>Matériel végétal</u>	37
1-1.2	<u>Matériel animal</u>	37
1-2	MATERIELS TECHNIQUES	38
1-2.1	<u>Milieu de culture</u>	38

1-2.2 <u>Produits chimiques</u>	38
1-3 APPAREILLAGE	38
2- METHODES ET PROCEDURES	40
2-1 PREPARATION DE OLSU	40
2-2 PREPARATION DU MILIEU DE CULTURE ET DE SERUM HUMAIN	42
2-2.1 <u>Milieu de culture</u>	42
2-2.2 <u>Préparation de sérum humain</u>	44
2-3 PREPARATION DES HEMATIES PARASITEES	44
2-3.1 <u>Lieux de Recrutement des malades</u>	44
2-3.2 <u>Critères d'inclusion et d'exclusion</u>	44
2-3.3 <u>Numération des parasites à la goutte épaisse et au frottis sanguin</u>	45
2-3.4 <u>Sélection des malades</u>	46
2-3.5 <u>Préparation de l'échantillon de globules rouges parasités</u>	47
2-4 CULTURE <i>IN VITRO</i> DE <i>P. FALCIPARUM</i>	48
2-4.1 <u>Définition</u>	48

2-4.2	<u>Test de chimiosensibilité</u>	49
2-4.3	<u>Préparation des plaques expérimentales</u>	49
2-4.4	<u>Test d'inhibition de la maturation des isolats</u>	52
2-4.5	<u>Détermination de la sensibilité à la Chloroquine et à OLSU</u>	58
2-5	METHODE D'ETUDE IN VITRO DE LA POTENTIALISATION	59
2-5.1	<u>Méthode d'étude de la potentialisation</u>	59
2-5.2	<u>Méthode d'analyse des résultats</u>	59

III - RESULTATS

61

1- LE PALUDISME DANS LA VILLE D'ABIDJAN

62

1-1 INDICE PLASMODIQUE 62

1-2 INDICE D'INFECTION PAR ESPECE 63

1-3 INDICE GAMETOCYTAIRE 63

2- EVALUATION DE LA CHLOROQUINORESISTANCE

63

3- EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIPLASMODIALE DE OLSU	68
4- EFFET DE L'ASSOCIATION OLSU / CQ SUR LA MATURATION DES TROPHOZOÏTES	71
④ - <u>DISCUSSION ET CONCLUSION</u>	78
1- ASPECT EPIDEMIOLOGIQUE DU PALUDISME A ABIDJAN	79
2- ISOLEMENT DU <i>PLASMODIUM</i> CQR ET SA SENSIBILITE A OLSU	80
3- ACTION SYNERGIQUE DE OLSU SUR L'ACTIVITE ANTIPLASMODIALE DE LA CHLOROQUINE	84
⑤ - <u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	87

LA LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Pages

Tableau I : Poids en gramme d'extrait obtenu à partir de 100g de la poudre de OLSU	42
Tableau II : Sensibilité des isolats érythrocytaires à la chloroquine	65
Tableau III : Importance des Chloroquinorésistances de <i>P. falciparum</i> dans chaque formation sanitaire	66
Tableau IV : Sensibilité des isolats CQS à OLSU	68
Tableau V : Sensibilité des isolats CQR à OLSU	69
Tableau VI : Réduction des CI50 de CQ en fonction des doses de OLSU	73
Tableau VII : Effet de OLSU sur l'activité de la CQ chez <i>P.falciparum</i> CQS et CQR et détermination de l'AEI	75
Fig.1 : Schéma d'extraction de OLSU selon la méthode de PHILLIPSON et O'NEIL, 1985	41
Fig.2 : Inhibition de la maturation de <i>P.falciparum</i> CQS et CQR par la Chloroquine	67
Fig.3 : Inhibition dose / effet de la maturation de <i>P.falciparum</i> CQS et CQR par OLSU	70

- Fig.4** : Inhibition de la maturation de *P.falciparum* (IS 001i, CQR) par CQ associée à différentes concentrations de OLSU 72
- Fig.5** : Histogramme de la potentialisation de la CQ à 25, 50, 100, 200 nM par OLSU sur IS 001i 74
- Fig. 6** : Histogramme de la potentialisation de la CQ à 50 nM par OLSU sur les isolats CQS et CQR 76
- Fig. 7** : Isobogrammes d'interaction Chloroquine-OLSU sur les isolats CQS (002i, 004i) et CQR (001i) 77

I-

INTRODUCTION

Le paludisme a sans doute accompagné l'homme au cours de son occupation de la surface de la terre ; de l'équateur au cercle polaire, on peut dire sans risque de se tromper, qu'aucune maladie n'a fait autant de victime (**GOLVAN, 1983**).

Les sociétés primitives voyaient dans la fièvre palustre la manifestation du châtiment divin, mais les égyptiens, eux, savaient déjà que cette fièvre survenait après les inondations et les pluies.

Hippocrate dans son premier livre <<des Epidémies>> décrivait les formes cliniques des fièvres et Diogène de Lacerte fut le premier à citer une épidémie de paludisme (**GOLVAN, 1983**).

De toutes les maladies parasitaires, le paludisme est la plus répandue avec, chaque année, des millions de malades à travers le monde. De ce fait, l'Organisation mondiale de la santé (O.M.S.) a consacré à la lutte antipaludique plus de moyens financiers que pour combattre toutes les autres grandes endémies.

Aussi croyait-on que l'éradication du paludisme dans les zones chaudes allait être définitivement acquise comme elle l'est déjà dans les régions tempérées. Malheureusement, les sentiments de victoire que nous avons eus entre 1955 et 1965 étaient prématurés (**GOLVAN, 1983**). Au contraire et de plus belle, le paludisme renaît de ses cendres là où l'on le croyait à jamais anéanti. N'y - a - t'il donc aucun espoir de vaincre cette maladie à brève échéance?

A l'heure actuelle, le paludisme est devenu une endémie majeure en raison de l'importance de la mortalité et de la morbidité qu'il provoque, et en raison du fait qu'environ 550 millions de personnes sont exposées à son risque permanent en Afrique au sud du Sahara (**GOLVAN, 1983 ; STRUCHLER, 1989**).

1 - LE PALUDISME

Des études réalisées en Afrique montrent une augmentation générale de la fréquence de cette affection due aux changements de l'environnement urbain et rural que la modernité impose aux pays en voie de développement. On peut citer le développement de l'agriculture irriguée en milieu urbain et dans les zones rurales : développement de petits barrages, des retenues d'eau, des bassins piscicoles et de la riziculture à travers toute l'Afrique intertropicale ; tout cela aggravé par la déforestation dans le sud (**MOUCHET et CARNEVALE, 1991**).

Cette situation est exacerbée par la résistance confirmée des parasites à la plupart des antipaludiques et par l'installation d'une multirésistance des anophèles vecteurs aux insecticides chimiques .

La large répartition géographique de l'endémie palustre dans le monde et la progression inexorable de la chloroquinorésistance sont une réalité désormais bien vivante en Afrique de l'ouest et surtout en Côte d'Ivoire. Cette diffusion est liée aux flux migratoires des populations, souvent porteuses asymptomatiques, qui provoquent l'extension de l'endémie (**CARLE et COLL , 1986**).

Cependant la chimiorésistance qui parfois passe inaperçue au sein d'une population à niveau d'immunité élevée, peut être révélée à l'occasion d'un accès palustre dans une population à immunité affaiblie. Ainsi, dans les régions de faible immunité, la prévalence des souches chimiorésistantes selon **CHARMOT en 1987** s'accroît progressivement.

Face à cette situation, il devient impérieux, de renouveler et d'améliorer la réserve des antipaludiques qui tend à vite montrer ses limites. La chloroquine et les

autres antipaludiques disponibles à l'heure actuelle, bien que toujours d'utilité sans contexte sont sujets à une résistance croisée des parasites palugènes (PINICHPONGSE et COLL , 1980 ; CAMPBEL et COLL, 1985).

1-1 EPIDEMIOLOGIE DU PALUDISME

L'épidémiologie du paludisme comporte selon **GOLVAN en 1983** quatre événements dont la simultanéité concourt au développement de la maladie .

- i- La présence d'hommes porteurs, de gamétocytes du *Plasmodium* dans le sang.
- ii- L'existence d'une population d'anophèles vecteurs qui, lors de leur repas sanguin sur l'homme impaludé, puisent ces gamétocytes et assurent la multiplication sexuée du parasite.
- iii- La présence d'hommes réceptifs au *Plasmodium*, en particulier les enfants autochtones et les immigrants en date récente. Les vecteurs infectés inoculeront à l'homme sain en le piquant, les sporozoïtes qui sont les formes infestantes des plasmodies.
- iv- Au rang des conditions écologiques nécessaires à la vie de l'anophèle et à celle du *Plasmodium* qu'il héberge il faut placer selon **MOUCHET et CARNEVALE, 1991** l'exigence thermique.

En outre, pour toute maladie transmissible, il importe qu'il soit atteint un <<seuil d'épidémisation>>, c'est-à-dire la densité critique des réservoirs de parasites d'anophèles et de sujets réceptifs pour que le paludisme puisse paraître, et se manifester ensuite comme cas sporadiques ou cas d'épidémies vraies (**GOLVAN , 1983**).

En 1990, l'O.M.S. a discerné trois zones de transmission variable de paludisme (**ROSSI, 1991**).

i- Les zones où la transmission du paludisme est solidement implantée ; elles sont limitées aux zones tropicales et subtropicales.

ii- Les zones à risque limité

iii- Les zones dans lesquelles le paludisme a disparu, a été supprimé ou n'a jamais sévi : ce sont l'Europe, l'Amérique du nord, les Antilles (sauf Haïti) et l'Australie.

En Côte d'Ivoire, le paludisme est hyperendémique et sa transmission est continue toute l'année avec des recrudescences pendant la saison pluvieuse. Mais d'une manière générale, il existe une différence de transmission entre le sud et le nord du pays (**KONE et COLL, 1990**)

Le vecteur du paludisme est un moustique *Culicidae* du genre Anophèle dont il existe plusieurs espèces. Le sexe des *Culicidae* se reconnaît par une antenne poilue chez le mâle et glabre chez la femelle. Le mâle a en plus, l'extrémité des palpes maxillaires spatulée (**GOLDEN , 1983**). Seule l'anophèle femelle est hématophage. L'espèce la plus fréquente en Afrique est *Anopheles gambiae* . La reproduction de l'anophèle femelle nécessite du sang à cause de ses protéines, nécessaires pour la nutrition de ses œufs, la chaleur et l'eau pour la maturation des larves.

1-2 SIGNES CLINIQUES ET DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

1-2.1 Signes cliniques

Le paludisme présente divers aspects cliniques selon l'espèce plasmodiale, la densité parasitaire (D.P.) et l'hôte. Les signes cliniques vont de l'accès fébrile aigu, avec ou sans défaillance viscérale grave, au parasitisme sanguin prolongé quasi asymptotique, en passant par un paludisme subaigu et chronique avec anémie et cachexie (**D'ANIS, 1991**).

Certains tableaux cliniques sont communs à toutes les espèces plasmodiales, même si l'on observe des nuances ou des degrés dans l'intensité des signes selon

le parasite. Ce sont des accès simples qui comprennent la primo-invasion et des accès de reviviscence schizogonique à fièvre périodique. Il en va de même du paludisme viscéral évolutif (P.V.E), appelé cachexie palustre, qui peut en principe être provoqué par toutes les plasmodies (**DANIS, 1991**).

* Accès de primo-invasion

-Fièvre continue, (39 à 40°C) parfois un peu irrégulière, sans périodicité régulière (les plasmodies n'ont pas encore atteint un état de développement synchrone)

-Céphalées, courbatures, malaise général, nausées, vomissements et diarrhées ;

Correctement traité, le malade guérit en quelques jours, dans le cas contraire,

le risque de passage à l'accès pernicieux est permanent s'il s'agit de *P. falciparum*.

C'est d'ailleurs les particularités symptomatiques liées à cette espèce qui retiendront notre attention.

* Accès simple à *P. falciparum*

Il débute par une sensation de fatigue, de malaise mal défini, de migraine ou de nausée puis s'installe l'accès palustre qui se manifeste par la succession de 3 stades caractéristiques :

Le Stade de frissons : le malade se plaint d'une sensation de froid intense et se couvre, sa température s'élève à 38° voire 40°C, il claque les dents, tout son corps est parcouru de frissons et il vomit.

Le Stade de chaleur : Les frissons cèdent la place à la température qui s'élève et atteint 40 à 41°C, la peau du malade est très sèche. Ce stade dure 3 à 4 heures.

Le Stade de sueur : le malade est couvert de sueur abondante avec un effondrement de la température ; il a une sensation de bien-être. Ce stade dure 2 à 4 heures.

En plus de ces caractéristiques qui se retrouvent aussi chez les autres espèces de Plasmodies, la fièvre prend un caractère périodique avec un rythme

tierce toutes les 48 heures. Les séquences frisson, chaleur, sueur ne sont jamais nettement réalisées (**BOURREE, 1994**).

Après une quinzaine de jours sans traitement, on évolue vers une anémie plus marquée. Alors le risque d'un accès pernicleux plane toujours surtout lorsque l'invasion a revêtu la forme clinique d'une fièvre rémittente.

L'accès palustre dû à *P. falciparum* est responsable d'autres complications tels que l'accès pernicleux ou neuropaludisme, le paludisme viscéral évolutif, et la fièvre bilieuse hémoglobinurique.

* L'accès pernicleux ou neuropaludisme constitue le grand drame, responsable d'un grand nombre de morts (**DANIS, 1991**). Il frappe les sujets non immuns, les enfants autochtones et immigrants et les adultes venant d'une zone non impaludée et ceux de zones d'endémie ayant séjourné longtemps en zone non impaludée qui reviennent dans leur pays natal.

*Quant à la fièvre bilieuse hémoglobinurique, elle apparaît comme une complication chez des personnes qui se soumettent à une prophylaxie et/ou à des traitements intempestifs de quinine (**GOLVAN , 1983**).

1-2.2 Diagnostic biologique

Il est certes possible de se baser sur les signes précurseurs qui apparaissent à la fin de la période d'incubation, pour diagnostiquer un accès palustre, mais c'est surtout du laboratoire que peut dépendre le diagnostic de certitude (**SCHNEIDER, 1960**). Les techniques de diagnostic actuellement en usage comprennent la mise en évidence des parasites dans le sang ou celle des anticorps contre le parasite dans les biopsies.

Il s'agit de l'examen microscopique de la goutte épaisse (G.E) et du frottis sanguin mince (**WERY, 1991**), du test Quantitative buffy coat (Q.B.C) selon **PARZY**

et COLL, 1990 , du test parasight, la titration des anticorps antiplasmodiaux dans le sérum, et l'Immunofluorescence indirecte (I.F.I) et l'utilisation des sondes nucléiques (WERY, 1991).

1-3 TRAITEMENT ET PREVENTION

1-3.1 Traitement

La principale stratégie actuelle de lutte contre le paludisme préconisée par l'O.M.S, est le traitement précoce et approprié des cas. Le succès de cette stratégie dépend de la chimiosensibilité des plasmodies circulantes (GUIGUEMDE, 1991).

Le traitement du paludisme comporte aussi bien des phases préventives que curatives qui sont toutes importantes aussi bien pour le clinicien que pour le praticien de la santé publique.

* Traitement préventif du paludisme (La chimioprophylaxie)

La chimioprophylaxie se définit comme la prise d'un médicament permettant de prévenir une infection, ses manifestations clinico-parasitologiques ou leur conséquence grave (BAUDON, 1991). Il existe trois niveaux de la chimioprévention

- la chimioprévention absolue ou étioprophylaxie ; elle permet d'éviter l'infection paludéenne en détruisant les formes pré-érythrocytaires des plasmodies comme les sporozoïtes et les formes hépatiques.

A l'heure actuelle, aucun médicament n'a d'action sur ces formes, à l'exception de la primaquine® (Amino-8-quinoléine) qui est malheureusement contre indiquée à cause de ses effets secondaires,

- le traitement présomptif des fièvres ; qui permet de guérir un éventuel accès palustre dû à *P. falciparum*.

- la prophylaxie suppressive ; qui agit sur les formes érythrocytaires du parasite et réalise un traitement suppressif précoce. On utilise à cet effet les schizonticides. A dose faible, ils peuvent éliminer les plasmodies ou maintenir une parasitémie suffisamment basse pour éviter l'accès palustre.

La chimioprophylaxie a deux applications qui sont la chimioprophylaxie collective et la chimioprophylaxie individuelle.

La chimioprophylaxie collective

Bien qu'elle concerne les populations autochtones des zones d'endémie palustre comme la Côte d'Ivoire, la chimioprophylaxie régulière et systématique est néanmoins contre-indiquée pour ces populations parce que la pression médicamenteuse est un des facteurs d'émergence de la chimiorésistance de *P. falciparum*.

En effet l'utilisation massive de la chloroquine en chimioprophylaxie de masse ou son utilisation à des doses curatives incomplètes contribue à la sélection de clones de parasites résistants. Cette chimioprophylaxie collective est également déconseillée chez les enfants car,

- outre la propagation de la chimiorésistance, elle entrave l'acquisition de l'immunité, -
- elle entraîne des effets secondaires (atteintes oculaire et auditive)
- enfin elle est coûteuse et inaccessible par les pays en voie de développement.

Cependant, la chimioprophylaxie collective reste indiquée pour certains sujets à risque comme :

- les femmes enceintes,
- les enfants de 0 à 5 ans,
- certains groupes professionnels se déplaçant temporairement d'une zone non ou peu impaludée à une zone où la transmission est intense (**GUIGUEMDE, 1991**).

La chimioprophylaxie individuelle s'adresse surtout aux individus non immuns effectuant un séjour en zone impaludée (**BAUDON, 1991**).

De ce qui précède, il ressort que l'attitude préconisée par l'O.M.S doit être le traitement présomptif de la fièvre quand une fièvre ne peut bénéficier de diagnostic précis et de traitement spécifique par les structures sanitaires locales.

* Traitement curatif du paludisme

Le traitement curatif du paludisme a pour but la guérison radicale. Il se limite parfois à la guérison clinique pour le sujet exposé à des infections répétées ; dans ce cas le choix de l'antipaludique à prescrire doit reposer sur les bases suivantes :

- L'espèce plasmodiale : la densité parasitaire et la présomption de chimiorésistance si *P. falciparum* est en cause,
- le patient : les signes de gravité, la possibilité de prise orale ou non du médicament, l'échec d'un traitement récent et l'immunité partielle (bien difficile à apprécier) (**CHARMOT, 1991**)
- les possibilités locales de traitement.

Traitement curatif du paludisme aigu à *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*

Le traitement du paludisme dû à ces espèces ne présente aucune difficulté puisqu'elles sont très sensibles aux amino-4-quinoléines (Chloroquine ou Amodiaquine) (**CHARMOT, 1991**).

Traitement curatif du paludisme aigu à *P. falciparum*

L'utilisation de schizonticide sanguin à action rapide est préférée.

-Dans les formes non graves tels que les fièvres de primo-invasion ou d'accès palustre tierce, il est possible d'utiliser un traitement de première intention faisant intervenir les amino-4-quinoléines comme la chloroquine ou l'amodiaquine.

- Par contre dans les formes compliquées marquées par des vomissements et des troubles de la conscience, avec une urine brunâtre, la voie parentérale (surtout la voie intraveineuse) est recommandée.

Le traitement du paludisme pour le clinicien tient de plus en plus compte du diagnostic présomptif en Côte d'Ivoire, à cause de la zone de forte endémicité dans laquelle nous nous trouvons.

Les examens de laboratoire ne présentent qu'un intérêt limité surtout pour le diagnostic du paludisme chez les enfants (**BAUDON, 1991**).

1-3.2 Prévention

La lutte antipaludique a été définie comme l'ensemble des mesures destinées à supprimer, ou tout au moins à réduire, la mortalité et la morbidité dues au paludisme (**MOUCHET et CARNEVALE, 1991**). Elle comporte aussi bien des actions curatives, basées sur la chimiothérapie pour des malades, que des actions préventives, basées sur la chimioprophylaxie, la vaccination pour les sujets à risque, et sur la lutte et la protection contre les vecteurs.

* Vaccin antipaludique

Compte tenu de l'accroissement de la chloroquinorésistance et la réduction de la sensibilité des anophèles aux insecticides, un vaccin antipaludique paraît de plus en plus souhaitable. D'ailleurs la mise au point d'un vaccin est un objectif prioritaire du programme spécial de l'O.M.S pour la lutte contre le paludisme. Ce vaccin idéal pourrait être polyvalent et contenir diverses fractions antigéniques. En effet le développement d'un vaccin passe obligatoirement par deux étapes : biologique et clinique. Le développement biologique vise à identifier les antigènes et caractériser

l'épitope dominant et l'étude clinique comprend quant à elle, l'étude de la tolérance et de l'immuno-génicité du vaccin et l'appréciation de l'immunité protectrice.

La phase qui suit doit enfin permettre d'apprécier l'efficacité réelle du vaccin et son inclusion dans les programmes de vaccination (**BRYSKIER et LABRO, 1988**).

Jusqu'à ce jour, deux types de vaccins ont été expérimentés chez l'homme.

-Un vaccin ant sporozoïte qui a consisté à immuniser avec des peptides synthétiques (**HERRINGTON et COLL, 1987**) ou recombinants (**BALLOU et COLL, 1987**). Les résultats ont été décevants : faible taux d'anticorps, faible nombre de sujets totalement protégés. De plus, ces anticorps induiraient la pénétration du sporozoïte dans l'hépatocyte (**NUDELMAN et COLL, 1989**).

-Un vaccin dirigé contre le stade érythrocytaire. Ce vaccin a été mis au point par une équipe colombienne (**PATTAROYO et COLL, 1987**). C'est un vaccin entièrement synthétique, polymère de plusieurs peptides. Ce vaccin dépourvu de toxicité a induit chez le singe une protection variant entre 30 et 60 %. Les premiers essais chez l'homme ont donné une protection du même ordre. Lors d'une conférence en Juin 1993, l'O.M.S, a eu l'honneur d'annoncer que le professeur colombien Manuel PATARROYO lui a fait don de toutes ses recherches sur ce vaccin antipaludique (**Le BRAS, 1993**).

Mais aujourd'hui, compte tenu des variations antigéniques et des mécanismes complexes d'échappement du *Plasmodium* aux anticorps (**MILLER et COLL, 1985** ; **HERRINGTON et COLL, 1987** ; **Mc CONKEY et COLL, 1990**) existe t-il réellement un espoir sur l'utilisation à grande échelle d'un tel vaccin antipaludique?

* Lutte antivectorielle

Cette lutte a essentiellement pour but de diminuer et si possible de supprimer la transmission du parasite (**O.M.S., 1974**) . La lutte contre les vecteurs est actuellement

la seule méthode de prévention collective utilisable quasiment partout. Sa mise en œuvre a été considérée comme onéreuse et devait s'appuyer directement ou

indirectement sur des structures spécialisées. C'est pourquoi un gros effort de recherche a été mené pour développer les outils efficaces de protection individuelle et de lutte intégrée faisant appel à la participation des communautés concernées (**MOUCHET et CARNEVALE, 1991**).

La lutte contre les anophèles est dirigée soit contre les stades larvaires (**KOUA, 1994**) soit contre les stades adultes. La protection individuelle ou collective s'adresse quant à elle aux stades insectes, seule forme vectrice.

La Lutte et la protection individuelle contre le moustique font appel à des moyens chimiques (insecticides et répulsifs), à des agents biologiques (les poissons larvivores, certaines bactéries qui infectent et tuent les larves) et à des moyens mécaniques (les moustiquaires simples ou imprégnées et les grillages protecteurs).

-Les insecticides et les répulsifs les plus utilisés sont les composés organochlorés comme le D.D.T et le gamma H.C.H. (lindane) et les composés organo-phosphorés comme le malathion (peu toxique), le fenitrothion et quelquefois le pirimiphos méthyle pour les traitements intradomiciliaires (**MOUCHET et CARNEVALE, 1991**).

Ainsi, de très nombreux produits sont utilisés localement comme répulsifs pour éloigner les moustiques ou les dissuader de piquer. On peut citer l'essence de citronnelle utilisée en Europe, l'huile de palme en Guinée, la fumée de diverses autres essences et surtout celle du <<neem>> (**MOUCHET et CARNEVALE, 1991**).

- Les Agents de lutte biologique réellement utilisés contre les vecteurs de paludisme sont les poissons larvivores comme les *Gambusia*, originaires d'Amérique, les *Oreochromis spilurias* en Somalie. Mais l'efficacité de ces poissons

est limitée. Ils sont peu susceptibles d'être utilisés dans des marres temporaires, comme celles servant de gîtes à *Anopheles gambiae* en Afrique. Outre les poissons,

la bactérie *Bacillus thuringiensis* sérotype H14 a été classée comme agent de lutte biologique. Mais cette bactérie ne pouvant pas se reproduire dans les gîtes, doit être répandue itérativement comme les insecticides (**MOUCHET, 1980**).

- Par la même occasion comme moyens mécaniques, les moustiquaires bien utilisées procurent une protection totale contre les moustiques. On peut aussi les imprégner des insecticides pyréthrinoïdes.

Par ailleurs les grillages ou moustiquaires métalliques ou plastiques, placés aux fenêtres, portes et autres ouvertures isolent parfaitement les maisons des moustiques et sont très prisés dans les pays anglophones.

En dépit des progrès indéniables réalisés dans ce domaine, on constate encore aujourd'hui l'échec des programmes de lutte antivectorielle, et la résistance des vecteurs aux insecticides (**BRYSKIER et LABRO, 1988**).

1-4 PHYSIOPATHOLOGIE DU PALUDISME

Les mécanismes intervenant dans la physiopathologie du paludisme sont à l'heure actuelle mal connus bien que cette maladie affecte des millions de personnes et que nous disposons de modèles expérimentaux largement améliorés grâce aux cultures *in vitro* (**AMBROISE - THOMAS, 1991**)

Dans l'Accès palustre simple, le facteur déclenchant la fièvre est la libération, au moment de l'éclatement des hématies parasitées, du pigment malarique (l'hémozoïne) qui se comporte comme une véritable substance pyrogène agissant sur les centres bulbaires de la thermorégulation (**AMBROISE - THOMAS, 1991**)

Lorsqu'un certain seuil de parasitémies est atteint, le nombre d'hématies parasitées qui éclatent en libérant ce pigment pyrogène est suffisant pour entraîner

des crises fébriles. Mais il est aussi probable que la fièvre soit provoquée par diverses cytokines, en particulier le Tumor Necrosis Factor (T.N.F) libéré par des macrophages activés par des antigènes plasmodiaux (**AMBROISE - THOMAS, 1992**).

L'anémie constatée au cours du paludisme résulte aussi bien de facteurs mécaniques (éclatement des hématies parasitées), que d'autres mécanismes tels que :

- la fixation sur les membranes érythrocytaires d'antigènes plasmodiaux solubles, responsables d'immuno-hémolyse sous l'action des anticorps correspondants ou auto-anticorps,
- l'action de facteurs plasmatiques libérés par les plasmodies qui fragilisent les parois érythrocytaires,
- l'activité opsonisante d'autres produits du métabolisme parasitaire, qui favorisent la phagocytose des hématies par les cellules monocytaires (**AMBROISE - THOMAS, 1991**).

Le Neuropaludisme est dû à *P. falciparum* et s'observe surtout chez des sujets non immuns tels que les jeunes enfants, les expatriés, les sujets vivant en zone hypo-endémique etc. Malgré de nombreux travaux récents, le détail des phénomènes physiopathologiques du neuropaludisme n'est pas encore clairement établi. Ils reposent essentiellement sur quatre hypothèses :

- une augmentation de la perméabilité de la barrière méningée entraînant une fuite du liquide céphalo-rachidien et un oedème cérébral,
- une coagulation intravasculaire disséminée,
- un phénomène immuno-pathologique avec dépôt d'immuno-complexes,
- des mécanismes complexes faisant intervenir les cytokines tel que le T.N.F. qui

génère

les

lésions

cérébrales

Quel que soit le mécanisme, le ralentissement du flux intracérébral provoque de l'anoxie, voire tardivement une véritable ischémie responsable d'une hémorragie péri-vasculaire et des lésions de la substance blanche (**AMBROISE - THOMAS, 1991**).

Les Complications rénales qui interviennent sont de deux sortes :

- Les atteintes rénales aiguës réversibles après traitement, s'observent avec *P. falciparum* et *P. Vivax*. Elles sont dues à un dépôt d'anticorps IgM principalement et de compléments sur la membrane basale des glomérules (**DANIS, 1991**).
- Les atteintes rénales chroniques irréversibles avec *P. Malariae* résultent d'un dépôt granuleux d'immuno-complexes.

2- LES ANTIPALUDIQUES

Depuis les découvertes empiriques, il ya plusieurs siècles, de l'activité de l'écorce de quinquina sur les « fièvres de marais» en Amérique du Sud, jusqu'à nos jours, plusieurs centaines de milliers de médicaments antipaludiques ont été étudiés.

A l'heure actuelle, moins d'une dizaine de ces produits sont disponibles, témoignant de la difficulté d'une recherche peu productive et du génie évolutif des plasmodies qui résistent de plus en plus aux médicaments.

Dans cette situation de pénurie, il convient de bien connaître les quelques produits encore utilisables afin de tirer le meilleur profit de leur qualité (**DANIS, 1991**). On peut classer les antipaludiques en fonction de leur point d'impact sur un des stades du parasite (Schizonticides, gamétocytocides), et en fonction de leur origine (naturelle ou de synthèse).

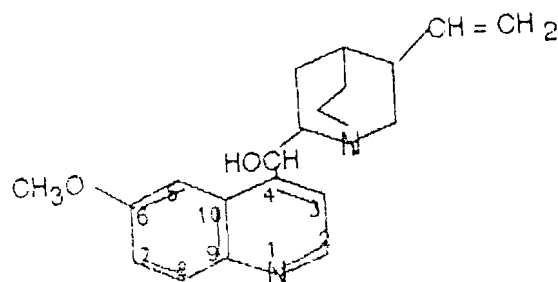
2-1 LES ANTIPALUDIQUES NATURELLES

Bien qu'il y ait eu en 1947 un criblage de plusieurs centaines de plantes supérieures (DANIS, 1991), seules trois classes majeures de produits antiprotozoaires ont pu connaître une utilisation clinique. Il s'agit de la quinine et de ses dérivés, de l'artémisinine qui sont des antipaludiques et de l'émetine qui est un amoebicide.

2-1.1 les alcaloïdes du quinquina

Parmi les quatre principaux alcaloïdes extraits du quinquina : quinine, quinidine, cinchonine et cinchonidine, seule la première, mise en évidence par Pelletier et Caventou en 1820 demeure l'antipaludique majeur. Cependant la quinidine qui est une diastéréoisomère de la quinine est active et parfois utilisée (GUERRA, 1977).

La quinine, première drogue antimalariale isolée de l'écorce de plusieurs espèces de cinchona Sud Américain (Le BRAS, 1993) est un alcaloïde qui comporte un cycle quinoléine et un radical carbinol en position 4.

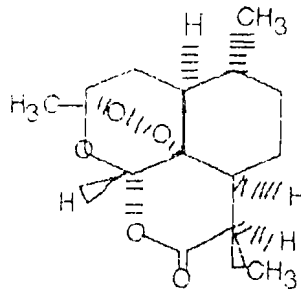


Toute modification de sa formule , diminue son activité antiparasitaire.

La connaissance de la structure chimique de la quinine a servi de modèle au développement et à la synthèse à partir de 1920 de plusieurs antipaludiques. Mais un regain d'intérêt des plantes comme nouvelle source d'antipaludiques a été suscité par l'apparition de *P. falciparum* résistant aux antipaludiques de synthèse. Ceci a permis

l'isolement récent de l'artémisinine, principe actif d'une plante médicinale chinoise, l'*Artemisia annua* L (BRYSKIER et LABRO, 1988).

2-1.2 L'artémisinine selon DAVIDSON en 1991 est un sesquiterpène lactone endoperoxide



Les sesquiterpènes lactones sont des constituants communs à certaines espèces de plantes mais la présence d'un endoperoxide confère ici une particularité antipaludique à l'artémisinine.

La réduction du carbonyl lactone et la formation d'un éther donne l'artéméther, un composé liposoluble, administré en intramusculaire (IM) et connu sous le nom de Paluther® (GU et COLL, 1980).

Un autre dérivé résultant de la réduction du lactone et la formation d'éther et d'ester donne l'artésunate de sodium commercialisé sous le nom de Arsumax® (SANOFI, WINTHROP, 1997).

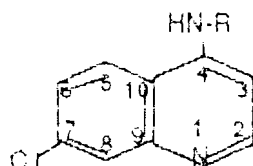
2-2 LES ANTIPALUDIQUES DE SYNTHÈSE

2-2.1 Dérivés de la quinine

La structure chimique de la quinine a servi de modèle moléculaire pour la synthèse de plusieurs analogues chimiques parmi lesquels nous pouvons citer :

Les amino-4-quinoléines

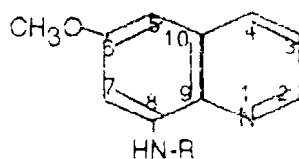
Elles font partie des premiers antipaludiques de synthèse isolés entre 1938 et 1941. Elles ont en commun un noyau quinoléine, une chaîne latérale aminée en position 4 et un radical chlore en position 7. On utilise actuellement la chloroquine ($R = C_9H_{20}N$) et l'amodiaquine ($R = C_{11}H_{16}ON$) (**DANIS, 1991**).



Les propriétés de base faible de la Chloroquine lui confère une activité antipaludique.

Les amino-8-quinoléines

Ce sont les gamétocytocides dont le plus connu est la primaquine®. Toutes les amino-8-quinoléines présentent une structure de base identique avec un noyau 6-méthoxyquinoléine et une chaîne aliphatique aminoalkylamine en position 8.

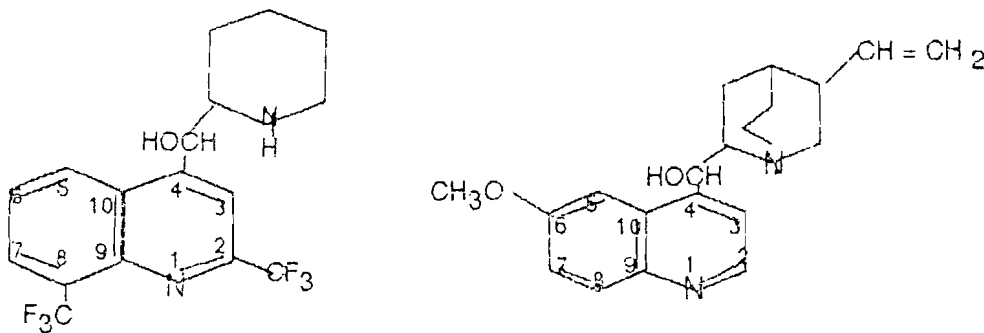


Plusieurs auteurs ont montré que toute modification de l'activité antiplasmodiale était fonction de la longueur de la chaîne aminoalkylamine et de la nature de l'amine terminale (**MAGIDSON et GRIGOROVSKI, 1936 ; MAGIDSON et RUBTOV, 1937**). Aussi l'activité est très augmentée par l'adjonction de groupements ramifiés. Ceci a permis la synthèse de molécules comme l'isopentaquine ($R = C_8H_{18}N$), la primaquine ($R = C_5H_{12}N$), le quinocide ($R = C_5H_{12}N$ mais ramifié), qui possèdent toutes des chaînes latérales. Malheureusement les dérivés des amino-8-quinoléines se sont révélés toxiques chez la souris.

2-2.2 Les aryl-amino-alcools

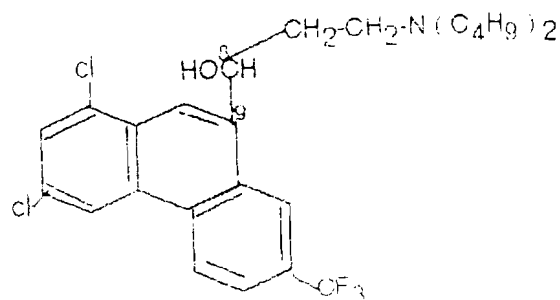
Cette famille d'antipaludiques schizonticides sanguins regroupe des composés identifiés à partir des années 1970. De structures chimiques diverses, elles ont en commun un radical méthanol (CHOH). Ce sont des produits déjà disponibles comme la méfloquine (dérivés quinoléines) ou l'halofantrine et d'autres produits à l'étude comme l'empiroline (DANIS, 1991).

La Méfloquine selon le même auteur est une 4-quinoléine méthanol dont la structure présente des similitudes évidentes avec celle de la quinine.



La présence en position 2 et 8 de groupements trifluorométhyles est nécessaire à l'activité antiplasmodiale.

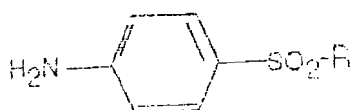
L'halofantrine toujours selon DANIS en 1991 est un composé qui a été l'objet du programme de recherche mis en place pendant la seconde guerre mondiale. La structure chimique de l'halofantrine est une 9 phénantrène carbinol, qui sous forme de chlorhydrate est très liposoluble mais peu hydrosoluble.



2-2.3 Les antifoliques et antifoliniques (BRYSKIER et LABRO, 1988)

Ce groupe d'antipaludiques est connu depuis les années 1950. Ils agissent en bloquant la synthèse des acides nucléiques de l'hématozoaire et comprennent les antifoliques et les antifoliniques.

Parmi les antifoliques disponibles, on peut citer les sulfamides et les sulfones qui se différencient par la nature de l'hétérocycle attaché au groupement sulfamide.



En règle générale la substitution de l'azote en position 1 des antifoliques réduit leur toxicité et aussi leur activité antiplasmodiale.

-Les antifoliniques sont les inhibiteurs de la dihydrofolate réductase (DHFR) . Ce sont des biguanides et des diaminopyrimidines. Ils sont le plus souvent utilisés en association avec les antifoliques, leurs modes d'action étant synergiques.



La diaminopyrimidine actuellement utilisée est la pyriméthamine qui est un meilleur inhibiteur de la DHFR de *P. berghei* (FINDLAY et COLL, 1946).

- Les biguanides représentent une classe chimique importante en thérapeutique. Ils sont utilisés non seulement en malariologie mais également dans le traitement symptomatique du diabète non insulino-dépendant.

2-3 MODE D'ACTION DES ANTIPALUDIQUES

Selon le site d'action du médicament sur l'un des stades du parasite chez l'homme, il est possible de classer les antipaludiques en quatre groupes :

- les schizonticides intraérythrocytaires,
- les schizonticides intratissulaires dans le foie,
- les gamétocytocides
- les sporonticides actifs sur tous les stades.

2-3.1 Les schizonticides intraérythrocytaires

A action rapide sur les formes asexuées intraérythrocytaires , comprennent les amino-4-quinoléines (chloroquine, amodiaquine), les amino-8-acridines et les aryls méthanolés. Ces médicaments peuvent être divisés en deux groupes en fonction des modifications physiologiques qu'ils induisent et de la basicité de leur fonction amine-terminale (**FITCH, 1986**) :

Les molécules du groupe 1 dont la chloroquine possèdent deux fonctions aminées qui en font majoritairement des cations bivalents à pH 7,4.

Ces molécules traversent difficilement la membrane des érythrocytes sains mais pénètrent rapidement dans les érythrocytes parasités en utilisant le système de transporteurs des acides aminés dibasiques (**FITCH et COLL, 1975; YAYON. et GINGBURG, 1982**). Elles agissent sur les vacuoles digestives du parasite, et entraînent leur fusion en donnant un aspect de large vacuole contenant des pigments, qui sont accumulés et rejetés hors du cytoplasme des cellules hôtes.

Les molécules du groupe 2 se trouvent sous forme monoprotannée à pH 7,4 et leur action est similaire à celle du groupe 1, mais plus lente.

Les schizonticides intraérythrocytaires à action rapide sont prescrits dans les accès palustres aigus.

Les schizonticides intraérythrocytaires à action lente sont des inhibiteurs de la synthèse de l'ADN et peuvent être classés en deux catégories en fonction de leur cible enzymatique.

- Les inhibiteurs de la dihydroptéroate synthétase dont les sulfones et les sulfamides agissent par compétition avec l'acide para-aminobenzoïque sur la dihydroptéroate synthétase, enzyme qui permet la transformation du dihydroptéroylglutamate en dihydrofolate. Ces antipaludiques sont des antifolates de type I.

- Le type II comporte les inhibiteurs de la dihydrofolate réductase dont la pyriméthamine et le proguanine, ce sont des inhibiteurs de la dihydrofolate réductase-thymidilate synthétase (DHFR-TS). La DHFR-TS est une enzyme bifonctionnelle chez le *Plasmodium* et agit à deux niveaux de la synthèse des nucléotides pyrimidiques. La partie N-terminale de la protéine assure l'activité dihydrofolate réductase et la partie C-terminale exerce l'activité thymidilate synthétase (**Le BRAS et BASCO, 1993**). Les schizonticides intraérythrocytaires à action lente sont surtout préconisés en prophylaxie.

2-3.2 Les schizonticides intrahépatiques

sont essentiellement les antifolates de type I : sulfones et sulfamides.

2-3.3 Les gamétocytocides.

Les schizonticides intraérythrocytaires sont presque tous actifs sur les gamétocytes matures et inactifs sur les gamétocytes immatures. Seuls les amino-8-quinoléines comme la primaquine® possèdent une action-gamétocytocide vraie, parce que actifs sur les gamétocytes matures et immatures (**JEFFERY et COLL, 1956 ; BURGESS et BRAY, 1961**).

2-3.4 Les sporonticides sont des médicaments qui agissent à tous les niveaux du cycle sexué ou asexué. Ils comprennent les amino-8-quinoléines (Primaquine) et les inhibiteurs de la DHFR.

3- LA CHIMIORESISTANCE DU *PLASMODIUM*

3-1 DEFINITION ET MESURE DE LA CHIMIORESISTANCE

3-1.1 Définition

La chimiorésistance est l'aptitude d'un germe à survivre ou à se reproduire malgré l'administration et l'absorption par le malade d'un médicament à des doses égales ou supérieures aux doses recommandées et employé dans les limites de tolérance du sujet (**O.M.S., 1965**).

Cette définition est différente de celle de l'échec thérapeutique qui traduit l'absence ou l'insuffisance d'activité d'un médicament à une dose habituellement efficace.

3-1.2 Mesure de la chimiorésistance

A l'heure actuelle, deux tests permettent de mesurer l'efficacité des antipaludiques à *P. falciparum*.

-*in vivo*, c'est la recherche de la chimiosensibilité de *P. falciparum* vis à vis d'un antipaludique ingéré à dose thérapeutique par un patient présentant un accès palustre monospécifique.

Le test généralement utilisé est le test simplifié de l'O.M.S. qui dure sept (7) jours. La réalisation peut être passive c'est-à-dire, pratiquée au laboratoire ou active si une équipe rend visite aux patients par enquêtes sur le terrain. (**BAUDON et COLL, 1988 ; OUEDRAOGO et COLL, 1990**). Il existe également des tests de 28 jours avec des examens parasitologiques supplémentaires au 14ème, 18ème, 21ème et 28ème jour à partir du jour de traitement noté J0 .

Les antipaludiques habituellement utilisés sont : la Chloroquine, l'Amodiaquine et la Sulfadoxine-Pyrimétamine. Le test standard OMS à la dose de 25 mg de

Chloroquine par kg, répartie sur 3 jours est généralement utilisé. Dans certains cas, l'Amodiaquine à la dose de 25 mg/kg sur 3 jours ou la Sulfadoxine-pyriméthamine (Fansidar®) en une prise est utilisée. Les sujets inclus dans l'étude doivent avoir une densité parasitaire à *P. falciparum* supérieure ou égale à 1000 globules rouges parasités par microlitre de sang (grp/ μ l) à la goutte épaisse (GE).

La prise préalable d'antipaludiques n'est plus un critère d'exclusion, il suffit d'améliorer le traitement si c'est nécessaire. La Chloroquine est utilisée comme antipaludique de première intention et les contrôles de la parasitémie sont faits aux 2ème, 4ème et 7ème jours.

Lorsqu'au 7ème jour, il persiste chez l'hôte des parasites sans signes cliniques (fièvre, hyperthermie, frisson etc...), on parle de **résistance parasitologique**.

Lorsqu'au contraire, le sujet a des parasites et des signes cliniques au 7ème jour, on parle de **résistance clinique** ou Véritable échec thérapeutique (GUIGUEMDE, 1991).

Il faut alors soumettre le malade à un autre antipaludique par un traitement de deuxième intention qui est en général la Sulfadoxine-Pyriméthamine (Fansidar®).

Si sept (7) jours après ce traitement, la GE est toujours positive, avec persistance des signes cliniques, on conclut qu'il y a une résistance au Fansidar® ; et on passe à un traitement de troisième intention avec les sels de quinine (Quinimax®, Quinoforme®).

Le test est difficilement réalisable en ambulatoire car dès qu'ils se sentent mieux, les malades ne se présentent plus au laboratoire pour la suite des analyses. Il faut aussi signaler les nombreux cas de prurit dû à la Chloroquine et à l'Amodiaquine, qui entravent ce genre d'étude.

Enfin, en fonction de la réponse parasitologique chez le sujet symptomatique ou asymptomatique, on distinguera :

a - la chimiorésistance de type **RI tardif** avec absence de parasites du 4^{ème} au 7^{ème} jour et leur réapparition après le 7^{ème} jour.

b - la chimiorésistance de type **RI précoce** avec absence de parasites aux 4^{ème}, 5^{ème} et 6^{ème} jour et leur réapparition au 7^{ème} jour.

c - la chimiorésistance de type **RII** avec présence de parasites au 3^{ème} jour et une densité parasitaire inférieure ou égale à 25 % de celle de J 0, la parasitémie restant positive jusqu' au 7^{ème} jour.

d - la chimiorésistance de type **R III** avec présence de parasites du 3^{ème} au 7^{ème} jour de traitement et une densité parasitaire supérieure à 25% de celle de J0 (**GUIGUEMDE, 1991**).

- in vitro. le test concerne les études faites au laboratoire dans un milieu de culture. Les tests *in vitro* montrent l'effet des antipaludiques sur le développement du *Plasmodium* en culture. Ces tests mesurent l'activité intrinsèque des drogues sans les facteurs interférents comme l'immunité de l'hôte (**PETERS, 1987**).

Outre les schizonticides sanguins déjà connus, le modèle *in vitro* permet également le criblage systématique de nouveaux antipaludiques.

3-1.3 Mécanismes de la résistance aux amino-4-quinoléines

L'efficacité sélective des amino-4-quinoléines et plus particulièrement de la Chloroquine est due à sa concentration élevée atteinte dans les érythrocytes parasités par rapport aux érythrocytes non parasités. La chloroquinorésistance est étroitement liée à la réduction de la concentration de la drogue dans les érythrocytes parasités (**FITCH, 1973**).

En effet la quantité de chloroquine concentrée dans les érythrocytes parasités par *P. falciparum* peut être presque analogue à celle des érythrocytes non parasités au bout de 70 jours de culture continue (FITCH, 1970 ; VERDIER et COLL, 1985). On observe par ailleurs que la concentration de Chloroquine dans les globules rouges parasités par le *Plasmodium* Chloroquinorésistant est inférieure à celle des globules rouges parasités par les Plasmodies chloroquinosensibles. Le rapport entre ces deux concentrations sert de base à la mesure de la Chloroquinorésistance.

Différentes hypothèses ont été évoquées pour expliquer ce phénomène. La plupart d'entre elles se réfèrent à la résistance aux schizonticides sanguins.

* l'hypothèse de la ferriprotoporphyrine IX, proposée par FITCH en 1986, attribue la résistance à la chloroquine à une séquestration de la ferriprotoporphyrine IX qui réduit la formation du complexe ferriprotoporphyrine-chloroquine, nécessaire à la lyse de la vacuole digestive du parasite.

* l'hypothèse de la perméase, suppose qu'une quantité importante de perméase chargée de porter la Chloroquine vers les vacuoles digestives s'accumule dans la membrane vacuolaire de *P. falciparum* résistant, probablement par suite de l'inefficacité du processus de transport et de dégradation de cette protéine. (WARHURST, 1986).

* l'hypothèse de l'efflux rapide de la chloroquine avancée par KROGSTAD, 1987, 1988 met en évidence la sortie plus rapide de la chloroquine hors de la vacuole des souches résistantes par rapport aux souches sensibles.

* l'hypothèse de GINSBURG, 1988 suppose une modification du pH vacuolaire due à la modification de la nature basique de la Chloroquine à partir de l'efflux de la Chloroquine.

De toutes ces hypothèses, celle de l'efflux rapide semble la plus en relation avec les données expérimentales.

3-2 BASES MOLECULAIRES DE LA CHIMIORESISTANCE

3-2.1 Résistance à la Chloroquine

Certaines cellules cancéreuses humaines exposées *in vitro* à un médicament anticancéreux deviennent résistantes à ce composé et à d'autres médicaments de mode d'action différente. Une pompe ATP dépendante située dans la membrane plasmique des cellules serait à l'origine de l'efflux de ces agents anticancéreux. Il a été mis en évidence chez l'homme par **RONINSON et COLL en 1986**, un gène appelé multidrogue résistance (mdr) dont l'amplification produirait la surexpression dans les cellules cancéreuses résistantes, d'une glycoprotéine membranaire de 170 Kda (GP 170) qui est une Phospho-glycoprotéine (**GROS et COLL, 1986 ; CHEN et COLL, 1986**). Cette glycoprotéine membranaire forme la pompe ATP-dépendante, responsable de l'expulsion des drogues hors de la cellule.

Un gène similaire (*P.falciparum* mdr) a été détecté chez *P. falciparum*, dont 60% de séquence nucléotidique seraient identiques avec le gène humain.

Il y a donc une corrélation entre l'amplification du gène *P. falciparum* mdr1, ou des mutations ponctuelles au niveau de ce gène et la résistance du *Plasmodium* à la chloroquine. En effet les *P. falciparum* chloroquinorésistants ont soit leur gène *P. f* mdr1 amplifiés, soit des mutations ponctuelles dans ce gène (**FOOTE et COLL, 1989 ; WILSON et COLL, 1989**). L'efflux de la Chloroquine hors de ces plasmodies est 40 à 50 fois plus importante que celui des plasmodies Chloroquinosensibles (**TRIGLIA et COLL, 1991**).

Le gène *P.falciparum* mdr1 qui code pour une glycoprotéine membranaire, localisée dans la vacuole digestive, serait le site d'action de la chloroquine.

La surproduction de ces glycoprotéines due à l'amplification de *P. falciparum* mdr1 ou sa modification due à des mutations ponctuelles dans le gène seraient responsable de l'efflux important de la chloroquine hors de la vacuole des plasmodies

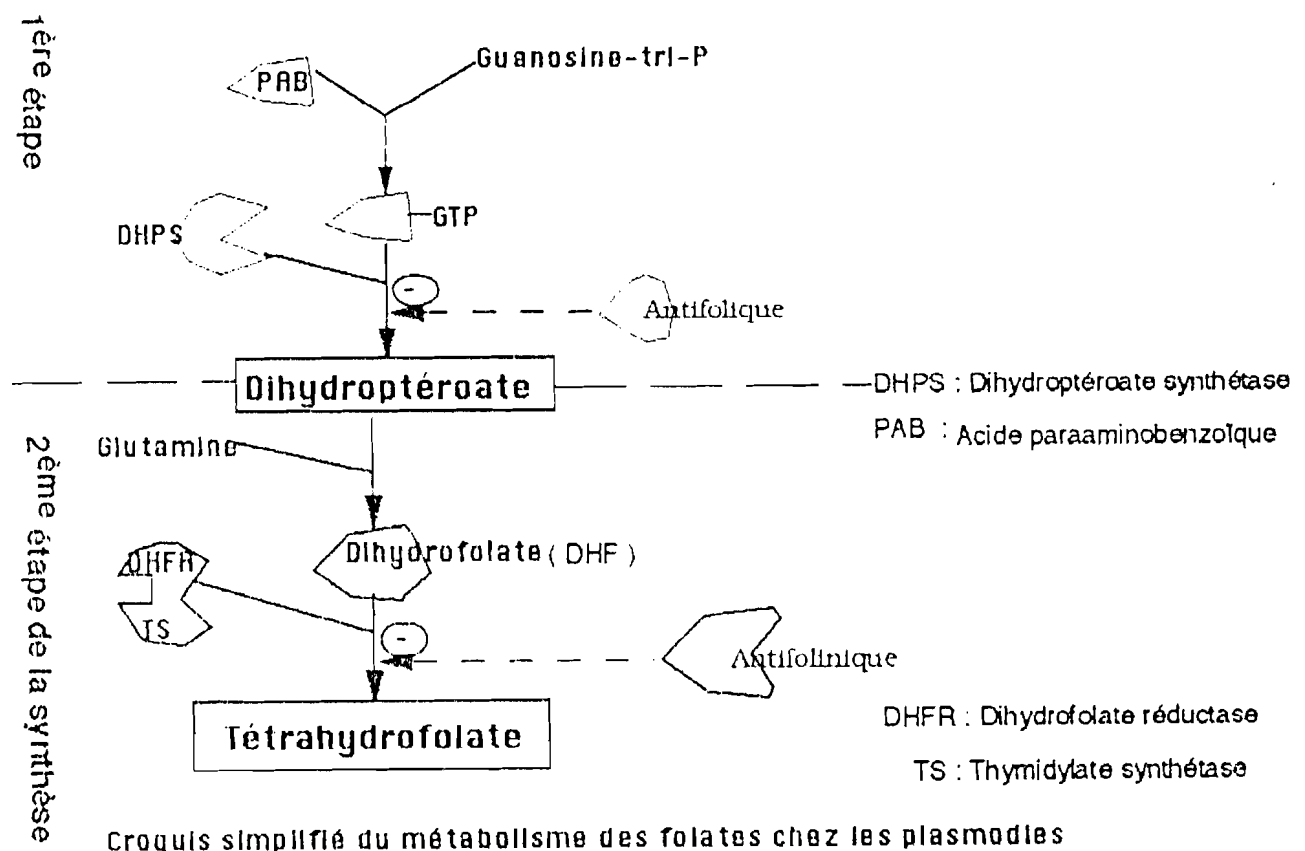
chloroquinorésistantes. La P-glycoprotéine plasmodiale agit comme une pompe ATP-dépendante.

3-2.2 Résistances aux antifoliques et antifoliniques

Les antimétabolites (antifoliniques, antifoliques) agissent sur la voie de la biosynthèse de l'acide folique chez le *Plasmodium* ; comme dans le cas des bactéries.

Les antifoliques sont des analogues de l'acide para-amino-benzoïque et sont donc en compétition avec cet acide sur le site actif de la dihydroptéroate synthétase. Ils inhibent la synthétase de l'acide hydrofolique, l'enzyme de la première étape de la synthèse de l'acide folique (Le BRAS et BASCO, 1993).

Les antifoliniques (pyriméthamine, proguanil) inhibent la réductase de l'acide dihydrofolique (la dihydrofolique thymidilate synthétase), l'enzyme de la deuxième étape de la synthèse de l'ADN du parasite (Le BRAS et BASCO, 1993).



Les antifoliques et les antifoliniques agissent comme des inhibiteurs de la dihydrofolate réductase thymidylate-synthétase (DHFR-TS), enzyme bifonctionnelle catalysant les réactions séquentielles de la biosynthèse de la désoxythymidine monophosphate (dTMP) qui aboutit à la synthèse de l'ADN du *Plasmodium*. Ces deux sous-familles de composés agissent séquentiellement sur la même voie métabolique du parasite, car le *Plasmodium* synthétise ses propres pyrimidines de *novo* parce qu'il est incapable d'utiliser l'acide folique de l'hôte.

L'efficacité de ces médicaments sur les plasmodies est basée sur leur haute affinité pour les enzymes plasmodiales par rapport aux deux enzymes (DHFR et TS) des cellules hôtes.

La résistance du *Plasmodium* à ces composés est due à une réduction de leur affinité pour la DHFR-TS. Cette baisse d'affinité est le fait d'une modification structurale de l'enzyme (CHEN et ZOLG, 1987). En 1979, KAN et SIDDIQUI ont supposé qu'il y avait une surproduction de DHFR-TS et un accroissement de la capacité d'utilisation des folates exogènes par le *Plasmodium*. Mais des études de la séquence du gène DHFR-TS ont montré que certaines mutations ponctuelles dans ce gène étaient responsables de cette baisse d'affinité (HYDE, 1989 ; 1990 ; PETERSON et COLL, 1990 ; WELLEMS, 1991).

3-3 POTENTIALISATION DES ANTIPALUDIQUES

3-3.1 Définition

La Potentialisation peut être définie comme étant l'action synergique de nouvelles substances antipaludiques capables de reverser la résistance aux antipaludiques usuels comme la Chloroquine, l'amodiaquine et de leur redonner leur efficacité première.

La recherche de telles substances est devenue une des actuelles priorités dans le domaine du paludisme.

3-3.2 Potentialisation de la chloroquine

La notion de potentialisation des antipaludiques plus particulièrement celle de la chloroquine a été conçue par **Martin et Collaborateurs en 1987**. Ils ont montré que les bloqueurs calciques associés à la chloroquine reversaient *in vitro* la chloroquinorésistance du *P. falciparum*. Ces bloqueurs calciques diminuent l'influx du Ca^{2+} dans les cellules de mammifères en inhibant les canaux calciques. Plus tard, d'autres auteurs ont mis en évidence l'effet potentialisateur des antidépresseurs tricycliques et des antihistaminiques sur la chloroquine (**BITONTI et COLL, 1988 ; PETERS et COLL, 1989**).

4-

NOS OBJECTIFS DANS CE TRAVAIL

Le développement des résistances de *P. falciparum* à la plupart des schizonticides, de celles du moustique aux insecticides et l'incertitude de voir naître un vaccin antipaludique utilisable à grande échelle, ont rendu nécessaire une réorientation de la recherche antipaludique vers la recherche de nouvelles molécules efficaces contre le parasite et le vecteur.

Ces nouvelles molécules ne doivent pas présenter de résistance croisée avec les amino-4-quinoléines en général et avec la chloroquine en particulier. Elles peuvent être obtenues soit par la synthèse soit par voie extractive à partir des substances naturelles.

Les nouvelles molécules de synthèse mis en circulation ces dernières années sont hors de portée pour la majorité des populations vivant dans les zones endémiques du paludisme. Ces molécules ont eu leur chance fortement réduite avec

l'apparition de sévères résistances plasmodiales ; ce fait a relancé la recherche antipaludique sur la voie des potentialisateurs. Ces substances sont capables de reverser le mécanisme de la résistance en s'opposant à l'efflux de la chloroquine hors du *Plasmodium*.

Notre objectif dans ce travail est de rechercher et de découvrir de nouveaux antipaludiques ne présentant pas de résistance croisée avec la chloroquine, l'antipaludique de référence, mais capables de la potentialiser.

Notre méthode d'approche est d'utiliser les données de la médecine traditionnelle pour isoler à partir des plantes traditionnellement prescrites dans le traitement du paludisme, des molécules à réelle activité antiplasmodiale, comme ce fut le cas il y a quelques années de l'artémisinine, un puissant schizonticide isolé du qinghaosu et dont les dérivés sont aujourd'hui disponibles dans les pharmacies pour le traitement du paludisme chloroquinorésistant.

Le qinghaosu extrait d'une armoise douce ou annuelle, *Artemisa annua L.*, est utilisé depuis plus de 2000 ans en médecine traditionnelle chinoise dans le traitement du paludisme (**JEREMIC et COLL, 1973**). Ce n'est qu'au début des années 1970 que les chercheurs chinois ont découvert son activité antiplasmodiale en culture *in vitro*. L'artémisinine n'est que la dernière série d'antipaludiques de source végétale actuellement disponibles et utilisées ; la tête de série étant la quinine. La quinine est de source végétale et vient de l'écorce de quinquina connue et utilisée en médecine traditionnelle par les indiens du Pérou pour traiter le paludisme (**Le BRAS, 1993**). Aujourd'hui la quinine et ses dérivés sont les antipaludiques de choix dans les formes graves du paludisme tel que l'accès pernicieux ou neuropaludisme et en cas de chloroquino-résistance.

Il nous a donc paru prometteur au vu des résultats préliminaires (**DJAMAN et COLL, 1994, 1997 ; DJE et COLL, 1997**) de mettre en évidence l'action

antiplasmodiale et potentialisatrice de *Olax subscorpioidae*, Oliv. une Olacacée de la pharmacopée ivoirienne à effet antipyrétique et traditionnellement utilisé dans le traitement des ictères et du paludisme.

MATERIELS ET METHODES

II-

1- MATERIELS

1-1 MATERIELS BIOLOGIQUES

1-1.1 Matériel végétal

L'espèce végétale utilisée dans ce travail est *Olax subscorpioïdae*, Oliv. de la famille des Olacacées. C'est un arbuste haut de 8 à 9 mètres dont les branches étalées, sont semi pendantes. Les rameaux âgés sont côtelés longitudinalement et transversalement striés. Les feuilles sont vertes, le pétiole nu est très court ; le limbe est glabre, lancéolé et oblong (**BOUQUET et DEBRAY, 1974**).

C'est une espèce de forêt, de forêt-galerie et des zones ombragées de savanes.

L'usage thérapeutique traditionnel de cette plante contre diverses pathologies est aussi bien connu en Côte d'Ivoire, qu'ailleurs en Afrique de l'Ouest. C'est un puissant fébrifuge utilisé pour soigner les gastro-entérites, les maladies vénériennes, les ictères et les accès palustres (**BOUQUET et DEBRAY, 1974**). Le macéré aqueux de l'écorce, de la racine et même des feuilles est utilisé en boisson et en bain pour le traitement de l'ictère et des accès palustres.

Il a été mis en évidence dans les feuilles de cette plante, la présence des saponines, de terpènes et des traces de tanins.

1-1.2 Matériel animal

- Du sang humain parasité par *P. falciparum* (Isolat) a été prélevé sur anticoagulant ACD (acide citrique dextrose), EDTA (Ethylène Diamine tetraacétate),
- du sang provenant d'individu non parasité essentiellement du groupe 0⁺ et,
- un mélange de sérums humains ont été également prélevés.

1-2 MATERIELS TECHNIQUES

1-2.1 Milieu de culture

Nous avons utilisé le RPMI 1640 (produit Sigma), qui est un milieu complexe, vitaminé, adapté pour la culture cellulaire et plus particulièrement celle du *plasmodium*.

1-2.2 Produits chimiques

- ACD (acide citrique dextrose) utilisé comme anticoagulant
- Bicarbonate de sodium en poudre, produit Riedel de Haën utilisé comme tampon
- Chloroforme
- Diff quick (colorant) produit Baxter Dade® composé de :
 - * une solution fixatrice contenant le fast green en méthanol 0,002 g/l
 - * une solution colorante I contenant de l'éosine G en tampon phosphate (pH 6.6)
 - * une solution colorante II contenant du colorant thiazine en tampon phosphate (pH 6.6)
- EDTA (Ethylène Diamine tetraacétate)
- Ethanol technique, 70°C
- Ether de pétrole
- Field (colorant) produit Merck®
- Giemsa (colorant) produit Merck®: azur éosine bleu de méthylène.
- HEPES produit Sigma utilisé comme tampon
- Méthanol technique 70°C

1-3 APPAREILLAGE

* Le Matériel utilisé pour la préparation des extraits de OLSU comprend :

- Un broyeur IKA® , utilisé pour broyer les parties (feuilles, écorces) de la plante

- Un agitateur magnétique chauffant IKA MAG ® RCT
- Un rotavapor Büchi 461 Water Bath, nécessaire pour l'évaporation des solvants
- Un soxhlet de capacité 1000 ml en Pyrex pour la délipidation
- Une balance de précision metter®

* Pour la culture *in vitro* de *Plasmodium falciparum*, il existe du matériel lourd dont les principaux sont :

- une étuve à CO₂, réglable, avec une humidité à 95 %
- un collecteur skatron de radioactivité
- un compteur β de radioactivité
- une hotte à flux laminaire

Ce matériel est nécessaire lorsqu'il s'agit du test isotopique utilisant l'hypoxanthine tritiée. A défaut, on utilise le test optique, qui a besoin d'un appareillage analogue mais moins onéreux. Les résultats obtenus dans les deux cas sont bien rapprochés. Dans notre travail, c'est le deuxième type de matériels que nous avons utilisé. Il se compose de :

- Deux becs bunsen : permettant de travailler dans un environnement stérile
- Une étuve régulée JOUAN® pour l'incubation de l'inoculum
- Une jarre à bougie dans laquelle nous créons une atmosphère riche en CO₂
- Une centrifugeuse sigma 301 et une autre sigma 201
- Un microscope optique (Leizt) binoculaire à immersion, pour la lecture des goutte épaisse
- Un vibreur automatique IKA®, Schüttler MTS 2
- Un réfrigérateur et un congélateur ***, pour la conservation des milieux

- Une autoclave pour la stérilisation
- Un bain marie Bioblock scientifique
- Un thermomètre
- Des plaques de culture multiwell® (Falcon 3047, Becton Dickinson Compagny)

A ce matériel, il faut ajouter d'autres petits matériels nécessaires pour les prélèvements, la confection des gouttes épaisses et des frottis minces, le lavage du sang etc.

2- METHODES ET PROCEDURES

2-1 PREPARATION DE OLSU

Les feuilles sèches de la plante ont été broyées à l'aide d'un broyeur automatique IKA® et 100g de la poudre obtenue ont été extraits selon la méthode de **PHILLIPSON et O'NEIL, 1985** qui utilise une série de solvants polaires : l'eau, le chloroforme, le méthanol après délipidation. La figure 1 présente la procédure.

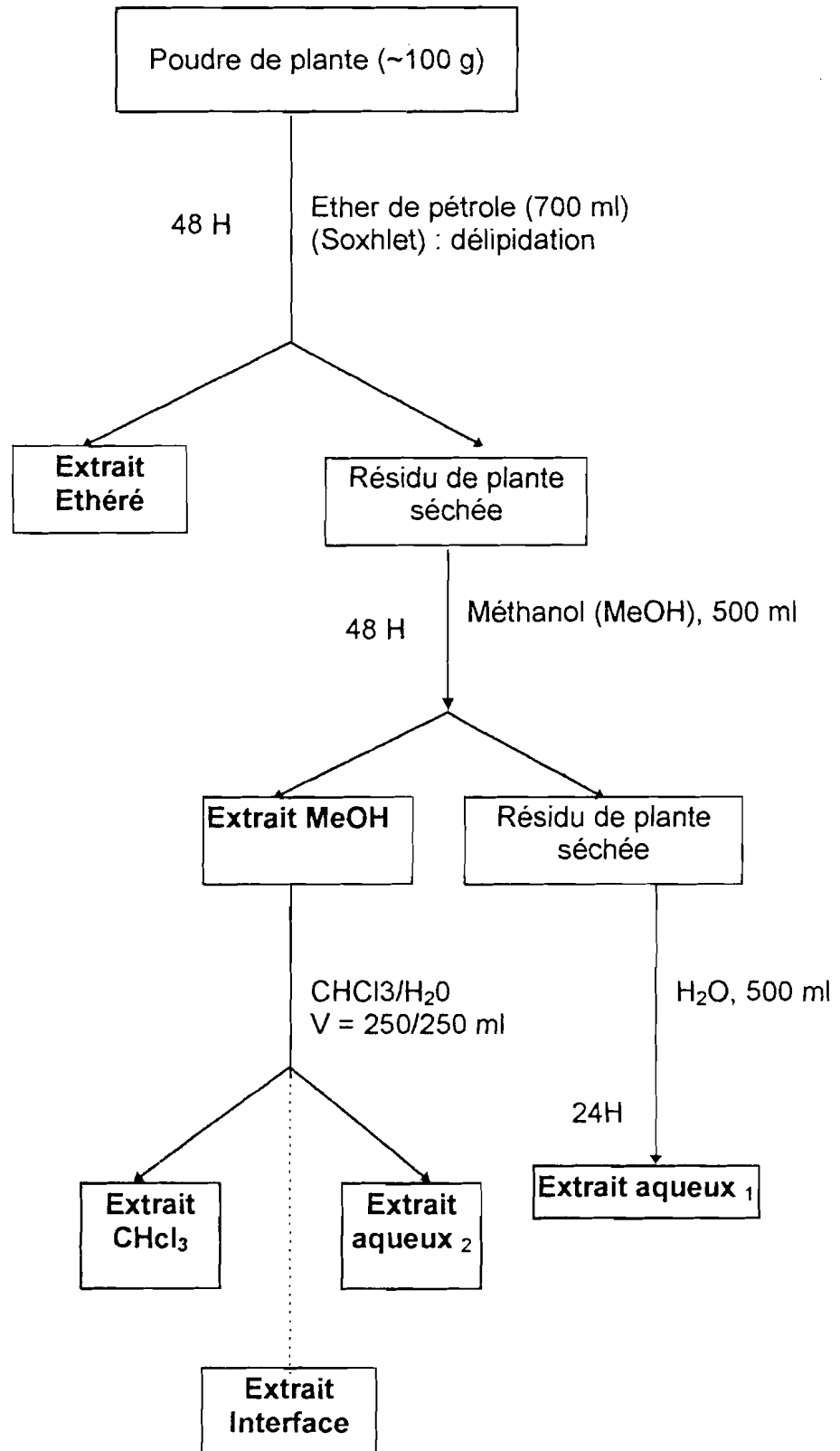


Fig.1 : Schéma d'extraction de OLSU selon PHILLIPSON et O'NEIL,1985

Cette méthode nous a permis d'obtenir six (6) différents extraits : étheré, méthanolique, aqueux issu de résidu de plante séchée et un autre issu du mélange Chloroforme/Eau, chloroformique, interface chloroforme/Eau. Chaque extrait est ensuite séché par évaporation du solvant à pression réduite dans un rotavapor Büchi 461 Water Bath.

Tableau I : Poids en gramme d'extrait obtenu à partir de 100g de la poudre d'OLSU

Type de solvant	Ether	Méthanol	Eau	Chloroforme	Interface Chloroforme/eau	Eau
Masse en g	3	5,25	0,029	0,008	1,074	3

Seuls, les extraits méthanoliques et aqueux sont totalement solubles dans l'eau, solvant idéal pour la culture *in vitro*. Les autres extraits, très peu solubles dans l'eau ou le méthanol, ne sont pas facilement utilisables pour les tests. Nous avons par conséquent, après des tests préalables, choisi les extraits aqueux et méthanoliques. Le produit obtenu à partir de l'extrait méthanolique a été finalement retenu pour sa meilleure efficacité dans les tests *in vitro* (DJAMAN et COLL., 1997 ; DJE et COLL., 1997)

2-2 PREPARATION DU MILIEU DE CULTURE ET DU SERUM HUMAIN

2-2.1 Préparation du milieu de culture

* RPMI de lavage

A 10,4 g de RPMI 1640 en poudre, on ajoute 5,94 g d'HEPES dans un erlenmeyer contenant 200 ml d'eau distillée. Le mélange est soigneusement agité à l'aide d'un agitateur magnétique (IKA MAG®) jusqu'à dissolution complète. Une solution de bicarbonate de sodium à 5% préparée la veille ou extemporanément est ajoutée à raison de 42 ml à la solution de RPMI 1640.

L'ensemble est complété à 1 l avec de l'eau distillée. Le pH de la solution est amené à 7,4 avec de la soude (1N) ou de l'acide phosphorique (85%). La solution est ensuite filtrée sur millipore 0,22 µm entre deux flammes de bec bunsen. La préparation obtenue est répartie en aliquotes de 100 ml dans des flacons stériles et conservée en chambre froide ou congelée. Cette conservation peut durer pendant un mois.

L'HEPES et le bicarbonate de sodium à 5 % jouent le rôle de tampon en maintenant le pH de la préparation dans les limites de 7,05 - 7,75 propice à la croissance plasmodiale.

Le principal objectif de ce double système tampon vise à empêcher la baisse du pH du milieu, due à la production d'acide lactique par les parasites lors de leur croissance.

La solution de RPMI de lavage ainsi préparée est la **Solution A**.

* Milieu de culture complet

A 100 ml de **solution A**, on additionne 10 ml de sérum humain. On obtient un milieu complet (RPS) qui peut être conservé huit jours au réfrigérateur. Au moment de son emploi, le RPS est de nouveau filtré sur millipore.

2-2.2 Préparation de sérum humain

Deux types de sérum peuvent être utilisés :

du sérum humain importé, dépourvu d'anticorps antiplasmodiaux ou du sérum local décomplémenté de groupe O, A, AB. Il est préparé selon la procédure suivante :

Le sang prélevé sous vide dans des tubes secs à centrifugation à partir de donateurs volontaires, est mis en exsudation 24 à 72 heures à température ambiante. Le sérum est recueilli à l'aide d'une pipette pasteur ; il est ensuite décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 2 heures dans un bain Marie.

Un pool de 3 à 5 sérums est ainsi décomplémenté et stérilisé par filtration sur millipore 0,22 µm. Les sérums sont répartis en aliquotes de 1 ml et congelés à 20°C.

2-3 PREPARATION DES HEMATIES PARASITEES

2-3.1 Lieux de recrutement des malades

Le choix des malades a été réalisé d'une part dans une clinique de Cocody (Centre Médical Ami) et d'autre part à l'Institut National de Santé Publique d'Adjamé (INSP) et le centre Hospitalier Universitaire de Yopougon (CHU). Les tests *in vitro* ont été majoritairement réalisés à l'INSP.

2-3.2 Critères d'inclusion et d'exclusion

* Les Critères d'inclusion sont :

- l' Accès palustre simple
- l'Infection monospécifique à *P. falciparum*
- la Densité parasitaire (D.P.) ou la parasitémie supérieure ou égale à 4000 globules rouges parasités par millimètre cube de sang
- les Malades de tout âge (à l'exception des nourrissons)

* Les Critères d'exclusion sont :

- la Présence de signe de gravité (selon l'O.M.S.) tel que l'accès pernicieux nécessitant une urgence dans le traitement,
- les Personnes très anémiées (GOLVAN, 1983).

2-3.3 Numération des parasites à la goutte épaisse (GE) et au frottis sanguin

La GE concentre les parasites sur une petite surface, facilite et accélère leur recherche. Quant au frottis sanguin mince, il permet surtout d'identifier les espèces et les formes plasmodiales. Toutes les deux méthodes permettent de dénombrer les parasites.

La D.P. est le nombre de parasites par millimètre cube de sang. Le principe de la numération consiste à compter les parasites par rapport aux cellules du sang tels que les globules rouges ou érythrocytes et les globules blancs ou leucocytes. Nous avons utilisé tantôt la numération érythrocytaire ou leucocytaire selon que nous voulons obtenir une parasitémie plus rapidement ou non.

* Numération par rapport aux globules blancs.

Cette méthode est utilisée pour les GE. Dans ce cas, on compte les formes asexuées des parasites par rapport aux leucocytes.

Si on estime à 6000 le nombre de leucocytes/mm³ de sang, l'expression de la densité parasitaire (D.P.) est :

$$D.P. = \frac{\text{nombre de parasites comptés} \times 6000}{\text{nombre de leucocytes comptés}}$$

En règle générale, on compte Y parasites pour 200 leucocytes (WERY, 1991).

$$\text{Alors la D.P.} = \frac{Y}{200} \times 6000 = Y \times 30$$

d'où D.P. = 30 Y parasites/mm³ de sang.

Au niveau de la GE, le seuil de détection est de 6Y parasites/mm³ de sang lorsqu'on compte 1000 leucocytes, soit Y parasite pour 1000 leucocytes, en pratique cette détermination est très fastidieuse.

* Numération par rapport aux globules rouges

La numération par rapport aux globules rouges est faite sur les frottis minces. Lorsqu'un frottis mince est bien fait c'est-à-dire un frottis avec les globules rouges juxtaposés sans chevauchement ni espacement, on estime à 400 le nombre de globules rouges par champ microscopique. Si on estime à 4.000.000 le nombre de globules rouges par mm³ de sang, l'expression de la densité parasitaire devient

$$D.P. = \frac{\text{nombre de globules rouges parasités} \times 4 \cdot 10^6}{\text{nombre de champs examinés} \times 400}$$

Plus le nombre de champs examinés est important, meilleure sera la précision. Dans le frottis, le seuil de détection de la parasitémie est de 100 parasites/mm³ de sang lorsqu'on examine 100 champs (WERY, 1991).

2-3.4 Sélection des malades

* A l'INSP et à la clinique AMI

L'équipe de prélèvement est placée dans une salle autre que la salle de consultation. Le médecin lui adresse les patients cliniquement suspectés d'accès palustre muni d'un bulletin d'examen, pour un diagnostic parasitologique. Chaque patient bénéficie d'une prise de sang au bout d'un doigt de la main pour la confection d'une goutte épaisse et d'un frottis sanguin mince sur la même lame.

Après coloration au GIEMSA® ou au field® et après lecture au microscope, tous les sujets porteurs de parasites ou non retournent avec le résultat de leur examen voir le praticien pour un traitement laissé à l'appréciation de celui-ci.

Mais avant d'aller chez le praticien, environ 10 ml de sang veineux sont prélevés sur anticoagulant ACD ou EDTA à partir des malades satisfaisant aux critères d'inclusion des tests *in vitro*. Les tubes de sang ainsi prélevés sont ensuite acheminés dans une salle spécialisée au laboratoire de microbiologie de l'INSP pour la réalisation des tests *in vitro*.

Certains patients ont par ailleurs bénéficié de contrôle gratuit pendant et après le traitement au 3ème, 4ème et 7ème jour.

* Au CHU de Yopougon

L'équipe de chercheurs placés dans le laboratoire de parasitologie, accueille dans la matinée tous les prélèvements de sang faits sur anticoagulant (EDTA) adressés à ce laboratoire pour une goutte épaisse et un frottis sanguin mince.

L'ouverture des tubes pour la confection de ces gouttes épaisses et frottis sanguin se fait de manière aseptique. Après coloration des lames au GIEMSA puis lecture au microscope, tous les prélèvements satisfaisant aux critères d'inclusion sont acheminés dans l'après-midi au laboratoire de microbiologie de l'INSP pour la réalisation des tests *in vitro*.

2-3.5 Préparation de l'échantillon de globules rouges parasités (GRP)

Le sang parasité est conservé à 4°C dans un délai maximum de 72 heures si le prélèvement a été fait sur l'ACD ou 24 heures si l'EDTA est utilisé comme anticoagulant. Si les globules rouges doivent être préparés juste après le prélèvement, le sang est centrifugé pendant 5 min. à 1800 t/min (G = 420). Après le temps de conservation ou centrifugation, il se forme deux phases :

- une phase supérieure, « translucide de couleur jaune pâle » qui est le sérum.

- une phase inférieure, rouge brique qui contient les globules rouges.
- l'interface, « buffy coat » contient les globules blancs et les plaquettes.

Le sérum et la couche leucoplaquettaire sont prélevés puis rejetés à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Le culot de globules rouges est lavé avec du RPMI de lavage. Une GE ou un frottis sanguin mince est réalisée pour déterminer la D.P. Si celle-ci est supérieure à 2% soit 8000 GRP/mm³ (densité parasitaire maximale pour la culture *in vitro*), le sang est dilué avec une préparation de globules rouges non parasités.

Les globules rouges non parasités sont préparés comme précédemment à partir du sang d'individus non parasités, de groupe 0⁺. Les hématies non parasitées peuvent être conservées avec un peu de milieu RPS pendant un mois en chambre froide.

2-4 CULTURE IN VITRO DE P. FALCIPARUM

2-4.1 Définition

Les isolats de *P. faciparum* sont maintenus en culture *in vitro* selon la méthode de Trager et Jensen (1976) dans du milieu RPMI 1640 complémenté de tampon HEPES, de bicarbonate de sodium à 5% et de sérum humain à 10% (milieu complet). L'inoculum est incubé dans une atmosphère appauvrie en oxygène et enrichie en gaz carbonique, avec une humidité de 95% et à une température de 37°C.

Cette méthode a évolué au cours des années pour devenir successivement le microtest de **RIECHMANN et COLL., 1978** adopté par l'O.M.S, le test de **DESJARDINS et COLL, 1979** et le semi-microtest de **Le BRAS et DELORON, 1983** et enfin de **Le BRAS et COLL., 1984**. Ces trois méthodes diffèrent légèrement suivant le volume de l'inoculum par puits, l'hématocrite, le nombre de puits par

plaque, la durée de l'incubation et le mode d'interprétation. Néanmoins elles donnent des résultats qui sont bien corrélés. (Le BRAS et SAVEL, 1987).

2-4.2 Test de chimiosensibilité

Il s'agit de cultiver un isolat de *Plasmodium falciparum* en présence de concentrations variables d'antipaludique dans le RPMI 1640 et de déterminer la concentration inhibant 50% de la croissance de cet isolat.

* Principe du semi-microtest

Comme les autres tests *in vitro*, le semi-microtest de **Le BRAS et DELORON, 1983** mesure la capacité à doses croissantes d'un antipaludique d'inhiber la transformation des jeunes trophozoïtes (PLANCHE 3A) et des trophozoïtes âgés en schizontes.

L'activité de l'antipaludique est appréciée en fin de test, soit par lecture microscopique, soit par l'incorporation de l'hypoxanthine tritiée (un précurseur de l'acide nucléique).

Dans le semi-microtest, le volume de l'inoculum érythrocytaire est de 700 μ l par puits, on utilise des plaques de culture à 24 cupules de diamètre 16 mm (Falcon 3047, Becton Dickinson Compagny) par plaque. Par ailleurs, il y a trois cupules par dose de produit et l'hématocrite est de 2,5 %. L'incubation peut se faire également à l'aide d'une jarre à bougie et dure 42 heures.

Dans le cas de notre étude, c'est la variante non isotopique du semi-microtest que nous avons utilisée.

2-4.3 Dilution des drogues et préparation des plaques

* Préparation de la Chloroquine

On prépare une solution de Chloroquine à 2,5 mg/ml dans du méthanol 70%. A partir de cette solution mère S, nous avons obtenu par dilution deux autres solutions dont une à 6,75 μ g/ml notée S' et l'autre à 0,675 μ g/ml notée S".

La solution S'' est à 1600 nM. Les solutions mère et diluées ainsi obtenues sont filtrées sur millipore 0,22 μm . Cette filtration se fait entre deux becs Bunsen allumés. La solution S peut être conservée longtemps à -20°C tandis que les solutions S' et S'' ne peuvent être conservées que pendant une semaine à $+4^{\circ}\text{C}$.

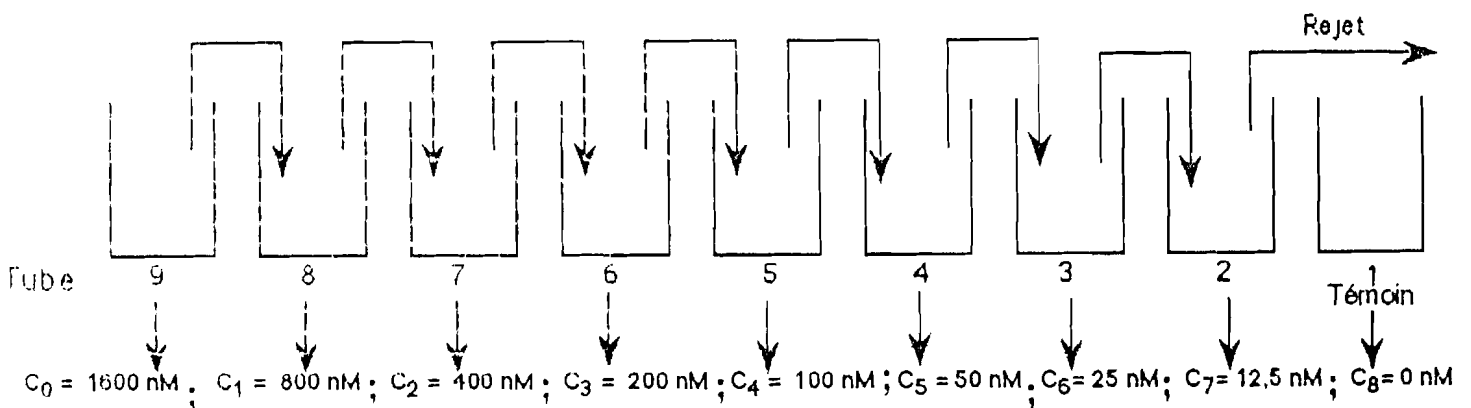
* Dilution de la solution S''

On dispose huit tubes eppendorf stériles entre deux becs Bunsen allumés (toute la manipulation se fait entre les deux flammes, Condition de stérilité). Le 9^{ème} tube contient 200 μl de la solution S'' préalablement filtrée.

A l'aide d'une pipette multicanaux munie d'embouts stériles, on distribue 100 μl de RPS dans chacun des huit tubes eppendorf, du tube 8 au tube 1.

On procède à des doubles dilutions dans du RPS de la solution S'' à l'aide d'une pipette pipet-man en prenant soin de changer les embouts chaque fois que cela est nécessaire pour éviter les contaminations.

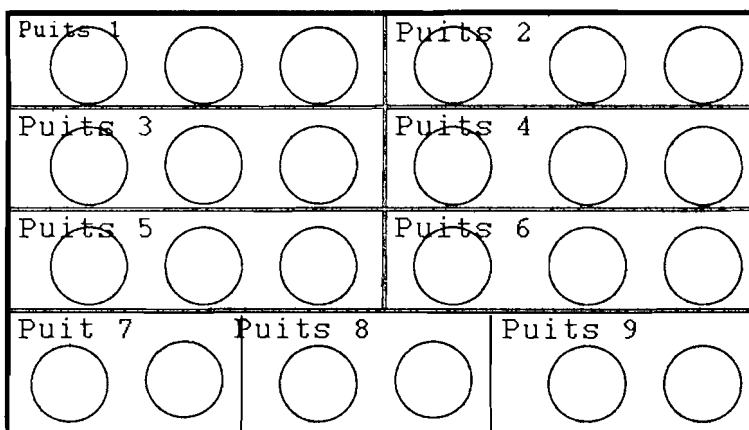
Le schéma suivant montre mieux la préparation par double dilution des concentrations de la Chloroquine à partir de la S'' contenue dans le tube 9 et dont la concentration molaire est de 1600 nM.



On obtient une gamme de solution de Chloroquine diluée de 800 à 12,5 nM.

* Préparation des plaques multiwell® expérimentales

A l'aide d'une pipette **pipet-man**, on distribue en triplet 25 μ l de solution de chaque concentration ; ainsi 25 μ l du tube 1 dans les puits 1, puis 25 μ l du tube 2 dans les puits 2, tube 3 dans les puits 3, tube 5 dans les puits 4, tube 6 dans les puits 5, tube 7 dans les puits 6. Ensuite, 25 μ l des tubes 4, 8, 9 sont également distribués mais en doublet respectivement dans les puits 7, 8, 9 (Voir Schéma d'une plaque multiwell® ci-dessous)



Les plaques ainsi préparées et dont les concentrations vont de 1600 nM à 12,5 nM sont dites à large gamme et peuvent être conservées pour plusieurs jours à la température du laboratoire (20°C) ou à la chambre froide.

* Antipaludique naturel (OLSU)

Cent microgrammes de lyophilisats obtenus à partir de l'extrait méthanolique sont dissouts dans un millilitre d'eau distillée. On obtient alors une solution-mère à 100 μ g/ml. A partir de cette solution-mère, nous avons effectué des doubles dilutions comme dans le cas de la chloroquine, pour obtenir une gamme de concentrations allant de 100 μ g/ml à 0,39 μ g/ml. Les solutions sont distribuées en triplets dans les cupules de plaques de culture.

2-4.4 Test d'inhibition de la maturation des isolats

Pour déterminer la sensibilité des isolats à la chloroquine, nous avons utilisé des plaques de chloroquine à large gamme de concentrations.

Les globules rouges parasités préalablement préparés, c'est-à-dire lavés trois fois avec du RPMI de lavage et correctement dilués avec des globules rouges sains (quand cela s'est avéré nécessaire), sont mis en suspension dans du RPS.

L'inoculum est ensuite distribué à raison de 700 μ l par cupule dans les plaques multiwell® à 24 cupules (PLANCHE 1A) contenant soit la chloroquine soit OLSU.

Les plaques sont ensuite homogénéisées par agitation sur vibreur automatique (PLANCHE 1B) pendant 30 secondes et déposées dans une jarre à bougie dans laquelle on crée à l'aide d'une bougie une atmosphère appauvrie en O₂ et enrichie en CO₂ (PLANCHE 2A). Ceci est possible lorsqu'on ferme la jarre et que la bougie s'éteint ; l'humidité dans cette jarre est maintenue à environ 95 % à l'aide d'une cuve d'eau. L'ensemble est incubé dans une étuve JOUAN® à 37°C (PLANCHE 2B).

* Contrôle microscopique de la culture et validité du test

Après 42 heures d'incubation, les plaques sont sorties et on procède à un contrôle microscopique des cupules témoins. En effet, puisque ces cupules ne contiennent pas de drogue, la maturation devrait être maximale. A partir des culots globulaires de ces cupules, nous avons effectué des gouttes épaisses sur des lames. Après séchage, et coloration de ces lames au GIEMSA, nous faisons la lecture au microscope à l'immersion.

On recherche la présence de schizontes (hémozoïne + mérozoïtes) éclatés ou pas sur les étalements (PLANCHE 4A). Pour que le test soit validé, le nombre de schizontes avec trois noyaux ou plus dans les témoins doit représenter au moins 10 % des parasites (O.M.S., 1982). Dans le cas contraire, c'est un échec et les plaques

sont rejetées. Par ailleurs, lorsque les cupules sont contaminées par des bactéries, le test est également considéré comme un échec.

* Réalisation des GE ou des frottis sanguins minces

Si le contrôle donne une bonne maturation des trophozoïtes en schizontes, le contenu des cupules ayant la même concentration de drogues est recueilli dans des tubes eppendorf puis centrifugé (Sigma 201m, G = 24g) à 1000 tours par minute pendant 2 minutes pour concentrer les hématies.

On réalise des gouttes épaisses ou des frottis minces pour une même concentration de drogue (PLANCHE 3B) : ces gouttes épaisses sont après séchage colorées 3 minutes au GIEMSA®; ou au Diff Quick® 15 sec. ou encore au field ® 1 mn 30 sec. Le choix du colorant dépend de sa disponibilité le jour de la manipulation. Les résultats obtenus avec ces différents colorants sont les mêmes, c'est seulement le temps de coloration qui diffère.

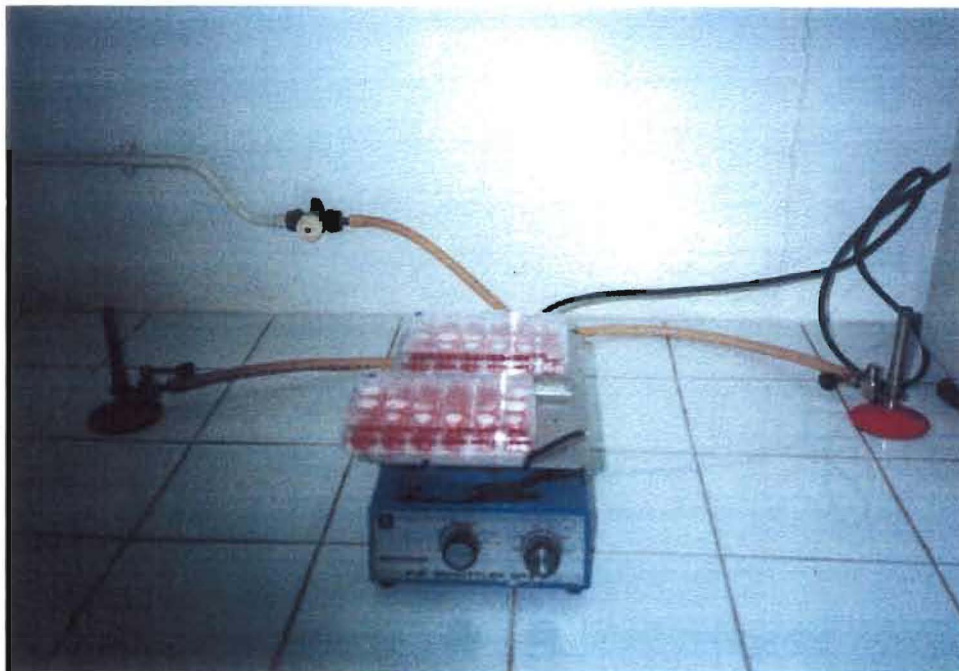
* Lecture des lames

La lecture des lames peut être immédiate ou différée. Nous la différons le plus souvent à cause de leur nombre (pour une plaque de culture, il faut lire environ trente gouttes épaisses ou frottis sanguins minces).

- Lorsqu'il s'agit de frottis, nous dénombrons les schizontes dans 25 champs, c'est-à-dire le nombre de schizontes pour 10.000 globules rouges.
- Dans le cas de la GE, on dénombre les schizontes pour 200 parasites asexués.



a- Distribution de l'inoculum dans les cupules d'une plaque Multiwell®



b- Agitation des plaques contenant l'inoculum sur vibreur automatique

**PLANCHE
1**

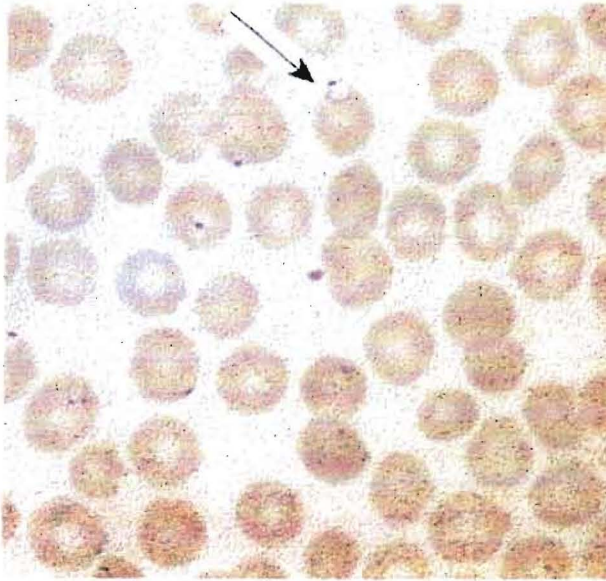


2a- Jarre à bougie contenant des plaques de culture chargées prête pour l'incubation.

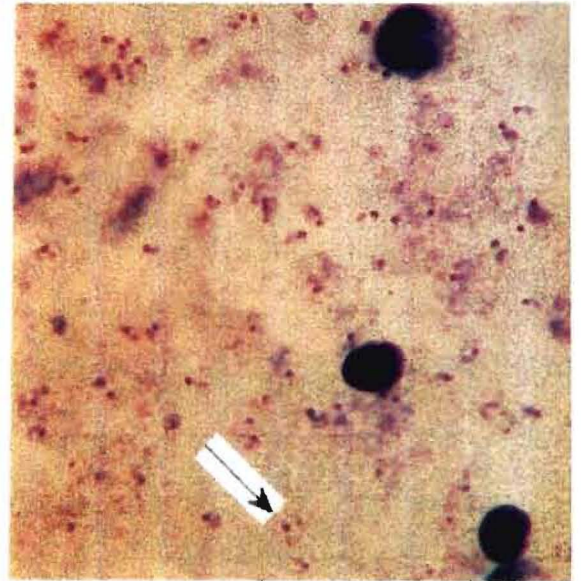


2b- Incubation de l'inoculum à l'étuve Jouan®

**PLANCHE
2**

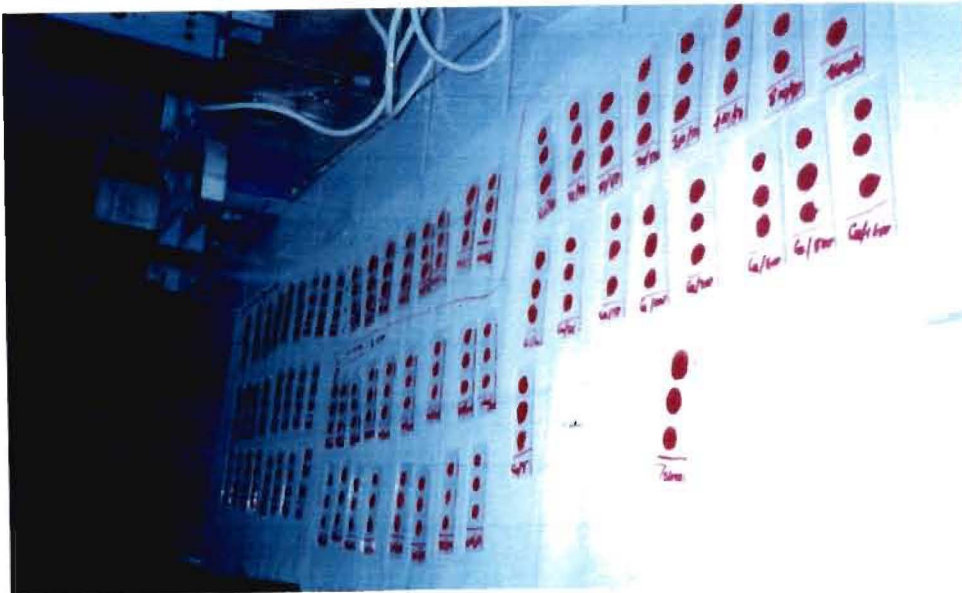


Frottis sanguin



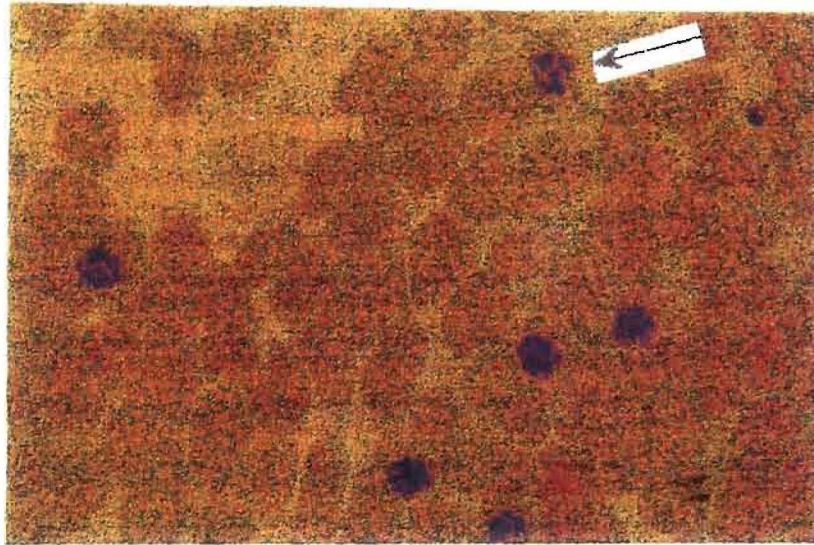
Goutte épaisse

3a- Sang parasité par *P. falciparum*
Stade : anneaux (jeunes trophozoïtes)
caractéristique : parasitémie élevée ; distinction claire
du noyau rouge et du cytoplasme bleu clair.

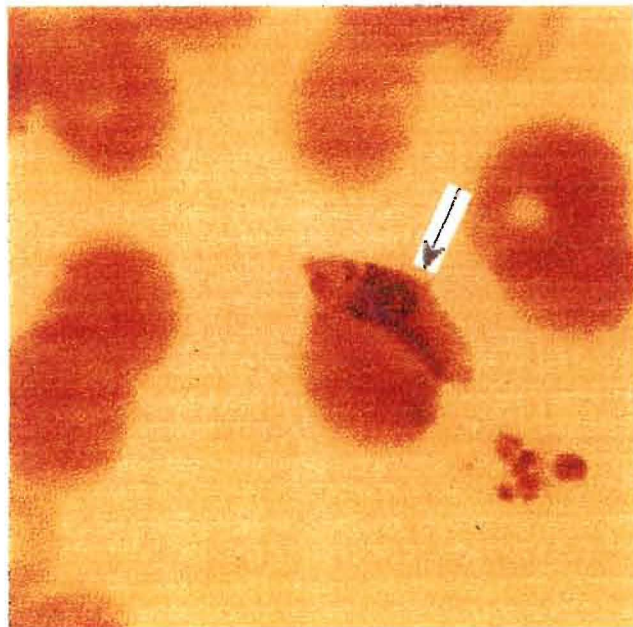


3b- Préparation de GE en fonction des concentrations
d'antipaludique après culture in vitro .

PLANCHE
3



**4a- Schizontes de *P. falciparum* en culture *in vitro*
(Schizontes non éclatés)**



4b- Gamétocyte de *P.falciparum*

**PLANCHE
4**

2-4.5 Détermination de la sensibilité des isolats à la Chloroquine et à OLSU

Pour la chloroquine comme pour OLSU, après la lecture microscopique des lames, nous avons calculé la moyenne des schizontes des témoins pour chaque plaque contenant un isolat. Nous avons fait de même pour chaque concentration de drogue donnée.

Soit X la moyenne des schizontes des cupules témoins

Soit y la moyenne des schizontes pour chaque concentration de drogue.

Le pourcentage de maturation pour chaque concentration est :

$$\% \text{ Maturation} = \frac{Y \times 100}{x}$$

Nous déterminons le pourcentage d'inhibition de la maturation des schizontes pour chaque concentration.

$$\% \text{ Inhibition} = 100 - \frac{Y \times 100}{x}$$

On peut ensuite soit tracer la courbe de la maturation des trophozoïtes en fonction de la concentration de drogue sur une feuille spéciale log-probit soit analyser les résultats à l'aide du logiciel probit à partir d'une droite de régression (droite d'ajustement) appelée la droite de Henry et déterminer la CI50 exprimée en concentrations d'antipaludique.

Nous avons choisi d'analyser les résultats à l'aide du logiciel cricket graphe sur Macintosh qui joint les points expérimentaux matérialisant les pourcentages de maturation en fonction des concentrations d'antipaludique. La courbe dose/effet d'inhibition de la maturation de trophozoïtes permet de déterminer la CI50 : c'est-à-

dire la concentration d'antipaludique qui inhibe de 50% la maturation des trophozoïtes.

Dans l'échelle de la chloroquinosensibilité, la CI50 critique est égale à 100 nM (Le BRAS et BASCO, 1991). Toutes les souches présentant une CI50 inférieure à 100 nM sont dites chloroquinosensibles (CQS) au-delà de 100 nM, les souches sont dites chloroquinorésistantes (CQR)

2-5 METHODE D'ETUDE IN VITRO DE LA POTENTIALISATION

2-5.1 Méthode d'étude de la potentialisation

Pour étudier l'effet d'un composé (OLSU) sur l'activité schizonticide de la chloroquine, des concentrations fixes du composé sont associées aux concentrations variables de la chloroquine. Ces concentrations fixes de OLSU sont choisies autour de sa CI50 sur chacun des isolats étudiés et associées à une gamme de doses de chloroquine allant de 12,5 à 1600 nM.

Les CI50 résultant de l'action de OLSU-Chloroquine associée sont déterminées sur des courbes dose/effet. Nous avons réalisé autant de plaques de culture que de concentrations d'antipaludiques associées.

Ces CI50 sont exprimées en pourcentage des CI50 de chaque antipaludique mesuré séparément.

2-5.2 Méthode d'analyse des résultats

* L'index de potentialisation de la chloroquine

L'index de la potentialisation du pouvoir schizonticide de la chloroquine (ou AEI pour «activity enhancement index») est calculé en divisant la concentration pour 90% d'inhibition (CI90) de la chloroquine seule par la CI90 de l'association de la chloroquine et de l'agent de potentialisation (OLSU). Le calcul de l'AEI est très

simple et rapide .Cet index nous permet de comparer le degré du blocage de l'efflux de la chloroquine entre différentes concentrations d'un composé donné et entre différents composés à une concentration donnée (**PETERS et COLL., 1989**). L'appréciation de l'AEI est suivie de l'analyse des droites de régression pour mieux caractériser l'effet potentialisateur du composé associé à la chloroquine.

* L'isobogramme

L'isobogramme est un tracé graphique classique en pharmacologie qui permet d'exprimer l'activité résultant de l'action simultanée de deux produits.

Les CI50 d'une association de composés sont portées sur les axes d'un graphique. Par convention, on porte en abscisse les CI50 conjuguées de la chloroquine et en ordonnée celles de la molécule associée. Sur chaque axe, la valeur 1 représente la CI50 de chaque produit pris à part. La pente de la courbe de régression des CI50 conjuguées de OLSU en fonction des CI50 conjuguées de la chloroquine est comparée à celle de la diagonale joignant les points des CI50 témoins (points unités) des deux axes.

- Si la courbe suit la diagonale, l'action des deux substances associées est jugée indépendante, chacune des substances agissant comme si elle était seule. Il s'agit **d'une synergie additive**.

- Si la courbe est convexe et située au dessus de la diagonale, la suppression mutuelle des activités indique la présence **d'un antagonisme**.

- Par contre si la courbe est concave et se rapproche des axes, il y a **potentialisation** ou synergie d'action entre les deux composés.

III-

RESULTATS

1- LE PALUDISME DANS LA VILLE D'ABIDJAN

Nous avons reçu au niveau des trois formations sanitaires qui ont été le centre de notre étude, 126 personnes suspectées de paludisme dont 76 à l'INSP, 20 à la clinique AMI et 30 au CHU de Yopougon. Cinquante (50) ont eu une goutte épaisse négative tandis que 76 étaient positives à Jo dont 51 à l'INSP, 11 à la clinique AMI et 14 au CHU de Yopougon. Un seul cas d'infection à *P. malariae* a été identifié, le reste étant une infection monospécifique à *P. falciparum*. Ceci a permis de définir quelques indices paludométriques.

1-1 INDICE PLASMODIQUE

L'Indice plasmodique (IP) est le pourcentage de sujets présentant des hématozoaires dans le sang par rapport à un ensemble de cas étudiés. Celui des enfants de moins d'un an permet d'évaluer la dynamique de la transmission. Chez les adolescents et les adultes, l'IP informe sur le degré d'immunité de la population.

L'indice plasmodique général est : $IP = \frac{76 \times 100}{126} = 60,31 \%$

L'indice plasmodique par centre de formation sanitaire

$IP/INSP = \frac{51 \times 100}{76} = 67,1 \%$, pour l'INSP

$IP/AMI = \frac{11 \times 100}{20} = 55 \%$, pour la clinique Ami

$IP/YOP = \frac{14 \times 100}{30} = 46,66 \%$, pour le CHU de Yopougon

1-2 INDICE D'INFECTION PAR ESPECE

L'indice d'infection (I I) est la proportion de sujets dont les étalements sanguins révèlent la présence du *Plasmodium*. Il est calculé pour une espèce donnée selon la relation :

$$I.I \text{ à } P.malariae = \frac{1 \times 100}{76} = \underline{1,31 \%}$$

$$I.I \text{ à } P.falciparum = \frac{75 \times 100}{76} = \underline{98,68 \%}$$

1-3 INDICE GAMETOCYTAIRE

L'Indice gamétocytaire (IG) est le pourcentage de porteurs de gamétocytes par cas infectés. Il indique le potentiel infectant de la collectivité étudiée et se calcule selon la relation :

Si aucun gamétocyte n'est observé dans les GE comme c'est le cas dans notre étude

$$IG = \frac{0 \times 100}{76} = \underline{0 \%}$$

2- **EVALUATION DE LA CHLOROQUINOESISTANCE**

Des 76 isolats érythrocytaires de patients présentant une infection à *Plasmodium* dans le sang, 47 ont pu satisfaire aux critères des tests *in vitro*.

Trente quatre (34) isolats parmi les 47 ont donné une bonne maturation des trophozoïtes en schizontes. Après la lecture de 1020 GE, la sensibilité de ces isolats à la Chloroquine estimée selon les C150, a été déterminée sur des courbes dose/effet de la chloroquine. Les résultats des tests présentés dans le tableau II montrent que 23 isolats sur 34 donnent des C150 allant de 25 à 99 nM de CQ. Ils sont donc

Chloroquinosensibles, les 11 autres sont Chloroquinorésistants, leur CI50 allant de 120 à 400 nM de CQ.

Le tableau III présente la prévalence de la résistance en fonction des centres de formation sanitaire.

Tableau II : Sensibilité plasmodiale des isolats érythrocytaires à la Chloroquine

N° d'Identifi- -cation des isolats	S 09i	IS 09i	IS 060i	IS 049i	IS 053i	IS 008i	IS 053i	IS 051i	IS 050i	IS 002i	IS 003i	IS 061i	IS 030i	IS 00 2i	IS 006 y	IS 01 7i	IS 019 y	IS 006 a	IS 036i	IS 004i	IS 003 y	IS 04 7i	IS 013 y
CI50 CQ en nM	25 ± 0.81	29 ± 0.81	34 ± 0.47	34 ± 0.94	50 ± 0.81	50 ± 1.2	54 ± 0.82	64 ± 0.81	65 ± 0.81	65 ± 0.47	65 ± 0.47	69 ± 2.05	70 ± 0.47	70 ± 1.2	74 ± 0	75 ± 0.4 7	78 ± 1.6	78 ± 0.47	80 ± 1.6	84 ± 5.7	90 ± 8.1	92 ± 0.4 7	99 ± 1.2
N° d'Identifi- -cation des isolats	IS 042i	IS 003a	IS 024i	IS 007i	IS 001i	IS 024y	IS 025y	IS 010i	IS 027y	IS 018i	IS 041i												
CI50 CQ en nM	120 ± 1.63	140 ± 2.94	150 ± 1.6	160 ± 0.47	240 ± 1.24	180 ± 0.47	195 ± 0.47	200 ± 0.94	245 ± 0.81	240 ± 0.81	400 ± 2.86												

Tableau III : Importance des Chloroquinorésistances de *P.falciparum* dans chaque formation sanitaire utilisée comme base de collecte de sang.

	C.M.A. Cocody	CHU Yopougon	INSP Adjamé	TOTAL
Nombre de GE	20	30	76	126
Médicaments pour test in vitro	CQ	CQ	CQ	CQ
Nombre de semi-microtests	6	12	29	47
Nombre d'échecs	2	4	7	13
Nombre de réussites	4	8	22	34
Sensibilité in vitro à la CQ	3	5	15	23
Résistance in vitro à CQ	1	3	7	11
% de résistance à la CQ	25 %	37,5 %	31,8 %	32,35 %

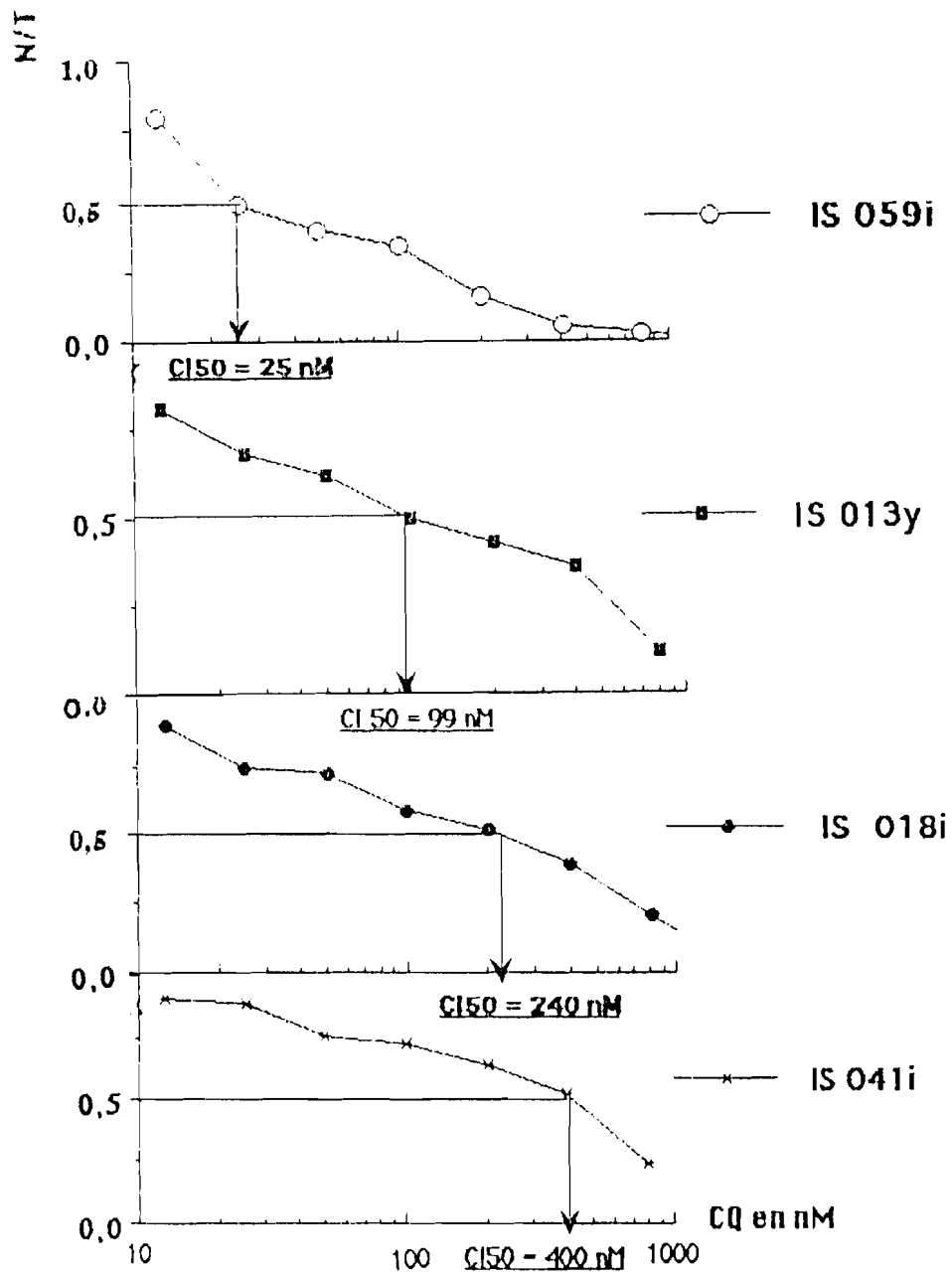


Fig.2 : Inhibition de la maturation de *P. falciparum* CQS et CQR par la Chloroquine (CQ)

3- EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIPLASMODIALE DE OLSU

La sensibilité des isolats érythrocytaires à OLSU a été testée en parallèle avec la Chloroquine. Ainsi 1020 GE ont été lues et interprétées. OLSU a une activité antiplasmodiale sur les isolats aussi bien CQS que CQR. Cette activité n'est pas fonction de la résistance de l'isolat à la chloroquine.

Les courbes dose/effet de OLSU sur les isolats IS013y (CQS) et IS041i (CQR) sont représentées sur la figure 3. Les CI50 sont respectivement de : $3 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ et $4,9 \pm 0.16 \mu\text{g/ml}$. De la même manière, les CI50 de l'action antiplasmodiale de OLSU sur les autres isolats ont été déterminées.

Les tableaux IV et V présentent l'ensemble des CI50 de l'activité de OLSU sur les isolats CQS et CQR.

Tableau IV : Sensibilité des isolats CQS à OLSU.

N° Identification des isolats	IS 059i	IS 029i	IS 060i	IS 049i	IS 053i	IS 008i	IS 053i	IS 051i	IS 050i	IS 002i	IS 003i	IS 061i
CI50 OLSU en $\mu\text{g/ml}$	0,59 \pm 0.008	0,9 \pm 0.24	1,8 \pm 0.16	0,7 \pm 0.16	0,79 \pm 0.004	0,38 \pm 0.1	0,7 \pm 0.047	0,58 \pm 0.06	0,48 \pm 0.21	0,84 \pm 0.1	0,3 \pm 0.08	1,2 \pm 0.2
N° Identification des isolats	IS 030i	IS 002i	IS 006y	IS 017i	IS 019y	IS 006a	IS 036i	IS 004i	IS 003y	IS 047i	IS 013y	
CI50 OLSU en $\mu\text{g/ml}$	2,5 \pm 0.05	2,5 \pm 0.047	1,4 \pm 0.12	0,74 \pm 0.04	1,1 \pm 0.16	2,5 \pm 0.047	16 \pm 2.49	1,4 \pm 0.08	0,55 \pm 0.06	0,79 \pm 0.10	3 \pm 0.047	

Tableau V : Sensibilité des isolats CQR à OLSU

N° Identification des isolats	IS 042i	IS 003a	IS 024i	IS 007i	IS 001i	IS 024y	IS 025y	IS 010i	IS 027y	IS 018i	IS 041i
CI50 OLSU en µg/ml	2,1 ± 0.047	2,2 ± 0.08	1,8 ± 0.09	5 ± 0.004	2,4 ± 0.28	3 ± 0.23	3 ± 0.18	1,5 ± 0.020	6,8 ± 0.2	2,6 ± 0.16	4,9 ± 0.21

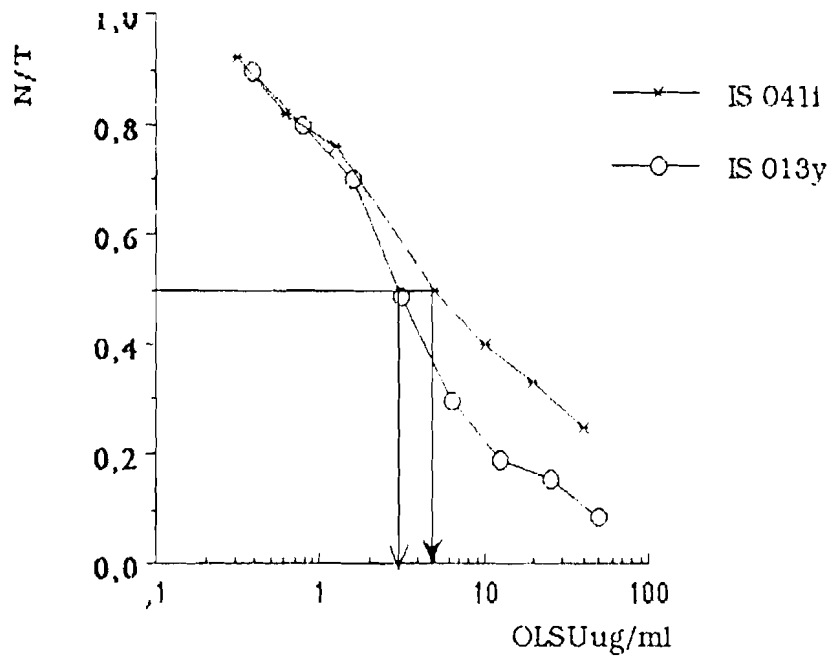


Fig. 3 : Inhibition dose/effet de la maturation de *P. falciparum* CQS et CQR par OLSU

4- EFFET DE L'ASSOCIATION OLSU/CHLOROQUINE SUR LA MATURATION DES TROPHOZOITES

Nous avons travaillé sur cinq isolats de *P. falciparum* dont trois ont eu une bonne maturation au cours des contrôles des témoins, soit trente semi-microtests effectués, avec dix sept exploitables et treize non exploitables. La figure 4 représente l'action dose/effet de l'association CQ/OLSU sur l'isolat CQR (001i). Il en est de même pour les isolats CQS (002i et 004i) sur le tableau VI. L'histogramme de la figure 5 à l'instar de la figure 4 montre l'effet potentialisateur de OLSU sur l'action antiplasmodiale de la Chloroquine sur l'isolat CQR IS_001i. Le tableau VII de la variation des valeurs des CI50 et CI90 de la Chloroquine en association avec OLSU et la figure 6 précisent l'effet de la potentialisation par la détermination d'un index de potentialisation dit **AEI=CI 90 de CQ**

CI 90 CQ/OLSU

Les isobogrammes de la figure 7 présentent les résultats obtenus de l'association OLSU-Chloroquine sur les isolats chloroquinosensibles 002i, 004i et sur l'isolat chloroquinorésistant 001i. On observe une synergie d'action des deux produits (CQ et OLSU) aussi bien sur les isolats sensibles que résistants et ceci par l'allure concave des courbes. Ce phénomène synergique est caractéristique de la **potentialisation de la CQ par OLSU**.

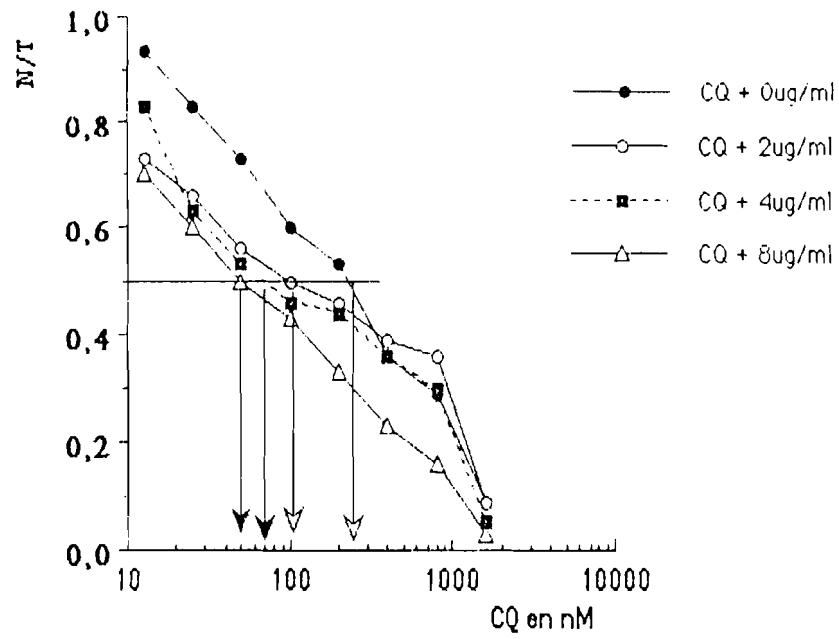


Fig.4 : Inhibition de la maturation de *P. falciparum* (IS001i) par CQ associée à différentes concentrations de OLSU

Tableau VI: Réduction des CI50 de CQ associée à OLSU

			DOSE DE OLSU (µg/ml)	CI50 CQ en nM	Réduction des CI50 en %
CQS	IS 002i	CQ +	0	70	-
			8	32	54
	IS 004i	CQ +	0	84	-
			8.8	28	56
CQR	IS 001i	CQ +	0	240	-
			8,00	50	79

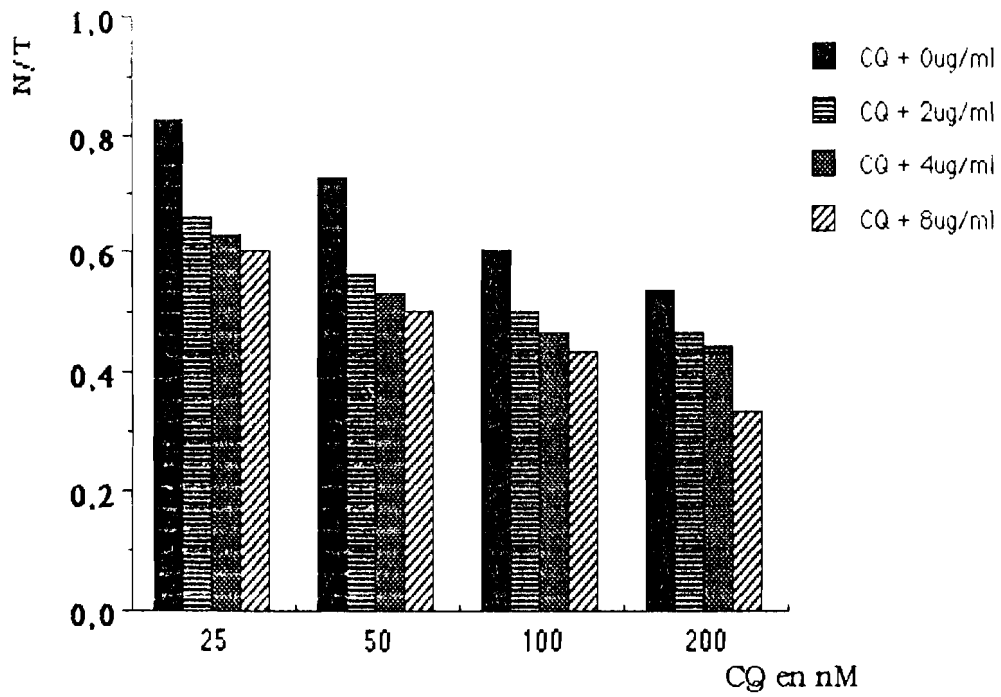


Fig. 5 : Histogramme de la potentialisation de la CQ à 25, 50, 100, 200 nM par OLSU sur IS 001i

Tableau VII : Effet de OLSU sur l'activité de la Chloroquine sur *P. falciparum* CQS
CQR et détermination de l'AEI (équivalent de l'index de potentialisation)

			DOSE DE OLSU ($\mu\text{g/ml}$)	CI50 CQ en nM	CI 90 en nM	AEI = $\frac{\text{CI90 CQ}}{\text{CI90 CQ / OLSU}}$
CQS	IS 002i	CQ +	0	70	1600	-
			8	32	550	2,90
	IS 004i	CQ +	0	84	1400	-
			8.8	28	900	1,5
CQR	IS 001i	CQ +	0	240	1600	-
			8,00	50	1500	1,45

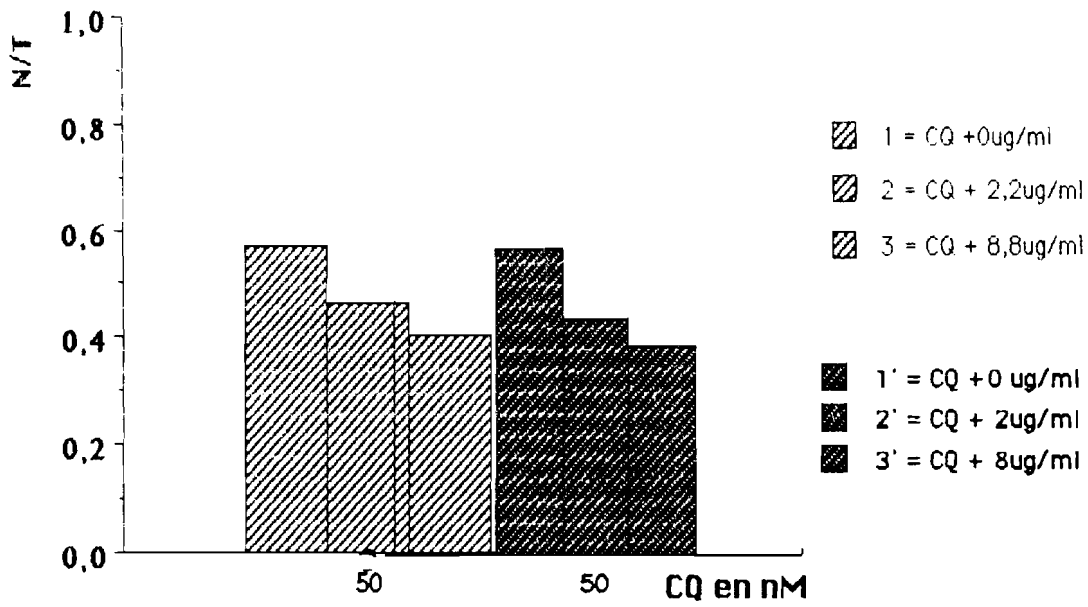


Fig.6 : Histogramme de la potentialisation de la CQ à 50 nM par OLSU sur les isolats CQS et CQR

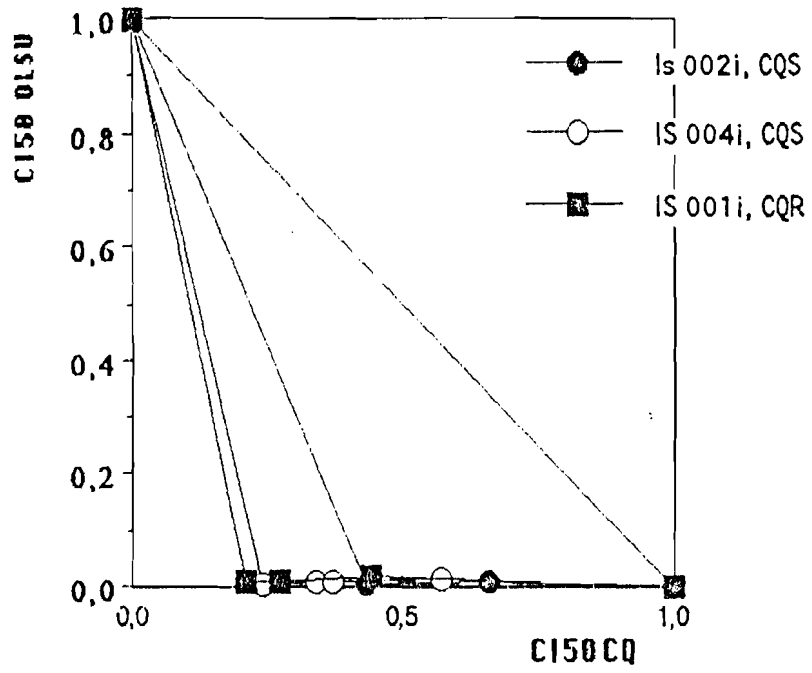


Fig.7 : Isobologrammes d'interaction CQ-OLSU sur les isolats CQS 002i et 004i et CQR 001i

IV-

DISCUSSION ET CONCLUSION

1- ASPECT EPIDEMIOLOGIQUE DU PALUDISME A ABIDJAN

Puis que cette étude n'a pas été faite de manière sélective sur les enfants de moins d'un an, il est difficile d'évaluer la dynamique de la transmission.

Néanmoins la prévalence plasmodique élevée (60%) rencontrée, traduit une forte pression anophélienne. **En 1990, KONE et Collaborateur** estimaient cette prévalence à 19% dans la ville d'Abidjan. D'une manière générale, la prévalence plasmodique en Côte d'Ivoire varie dans l'espace et dans le temps. **En 1992, KOUASSI KOUADIO** a montré que cette prévalence était de 36% dans les agglomérations d'Abidjan.

Cette forte prévalence peut être due à l'assainissement et à l'hygiène générale de la ville d'Abidjan qui comporte des retenues d'eau dans les caniveaux, des entassements de déchets ménagers qui constituent de véritables gîtes très productives en larves de moustiques (vecteurs de plasmodies).

L'indice d'infection au cours de cette période d'étude a été de 98,64% pour *P. falciparum* qui demeure majoritaire dans la ville d'Abidjan comme ailleurs en Afrique de l'Ouest. Cette espèce est la plus fréquente dans les zones forestières et côtières de l'Afrique (**ADJETTEY, 1995**). C'est elle qui pose d'énormes difficultés en matière de traitement.

Si pour le clinicien, le fait de disposer d'un éventail d'antipaludiques qu'il peut utiliser selon les cas est un avantage certain, l'agent de santé publique ne pourra quant à lui atteindre son objectif que s'il dispose d'un médicament ayant une action suppressive rapide et complète, un médicament de toxicité nulle, d'un prix modéré, facile à utiliser et n'induisant pas ou peu de chimio-résistance. La chloroquine qui demeure l'antipaludique de choix se rapproche de ce profil (**MOUCHET et COLL., 1991**). Malheureusement, dans les zones de fortes endémicités, ce médicament se

heurte à une Chloroquinorésistance qui repose le problème d'un antipaludique répondant à ces critères de médicament à action complète.

En attendant, la lutte contre le paludisme doit s'intensifier et insister sur :

- i -un diagnostic rapide et un traitement précoce, et sur le strict respect de la posologie de la Chloroquine et d'autres antipaludiques de référence,
- ii -une utilisation de moyens de protection contre les piqûres infestantes ,
- iii -une chimioprophylaxie au cours de la grossesse et chez certains sujets à risques,
- iv -un assainissement des milieux d'habitation : élimination des gîtes à moustiques.

2- ISOLEMENT DU *PLASMODIUM* CQR ET SA SENSIBILITE A OLSU

A l'analyse des résultats, il ressort que le taux moyen (32,35 %) de chloroquinorésistance détectée *in vitro* et en circulation au niveau des trois formations sanitaires, Clinique AMI ; CHU Yopougon ; INSP qui ont été le centre de notre étude est sûrement élevé. En ce qui concerne la Clinique AMI et le CHU de Yopougon, les taux de résistance suscitent très peu de commentaire en raison de la taille négligeable d'isolats testés.

L'INSP par contre qui a servi de base à notre étude et dont le nombre d'échantillons est plus élevé (76% de semi-microtests interprétables), a un taux d'isolats chloroquinorésistants égale à 32 %. C'est un taux élevé mais en dessous de celui rapporté par **LE CORRE en 1989** qui était de 61% dans le même centre. Son étude ayant porté sur treize isolats de *Plasmodium falciparum*.

En effet ,selon **GUIGUEMDE, 1991** dans une zone d'endémie palustre, il est possible de trouver dans une population plasmodiale des éléments anormaux. Si cette anomalie est un caractère de chloroquinorésistance, le phénomène ne peut prendre de l'ampleur que s'il y a un facteur favorisant la multiplication des mutants telle que la chimioprophylaxie de masse qui n'est plus de règle de nos jours. En général les premiers mutants qui apparaissent sont très peu nombreux par rapport aux éléments normaux. Selon la loi des équilibres biologiques leur nombre (les éléments anormaux) reste aussi longtemps plus élevé s'il n'y a pas d'intervention de facteurs extrinsèques. Ainsi lorsqu'on utilise un médicament, celui-ci va éliminer les individus sensibles et l'équilibre sera rompu en faveur des mutants résistants ; ceci suppose que plus on utilisera ce médicament plus on sélectionnera sans le savoir des résistants. La résistance à la Chloroquine a été observée souvent dans les pays où ce produit a été employé massivement en chimioprophylaxie collective.

Il résulte de ce qui précède que la pression médicamenteuse permet l'émergence des mutants préexistants et non pas l'habituation progressive des parasites à des doses croissantes de médicament.

Par ailleurs l'immunité (humorale ou cellulaire) toujours selon cet auteur agit de la même manière sur les Plasmodies qu'elles soient normales ou mutantes. Dans une zone d'hyperendémicité ou de transmission continue du paludisme comme la Côte d'Ivoire, le degré d'immunité de la population est élevé et les mutants résistants qui échappent à l'action du médicament sont attaqués par les facteurs de l'immunité. Si le niveau d'immunité n'est pas suffisant (sujets expatriés, jeunes enfants non encore immuns, adultes en état de déficit immunitaire), ces mutants résistants pourront se multiplier et engendrer des manifestations cliniques. Cette catégorie de sujets permet donc la dissémination de mutants en cas de chimioprophylaxie .

Enfin un voyageur non immun va transférer des mutants résistants d'une zone de chimiorésistance à une zone où ces résistants n'existaient pas. Les sujets non immuns de la zone d'accueil vont alors permettre le développement de la résistance (GUIGUEMDE, 1991).

La baisse ou la stabilité du taux de chloroquinorésistance constatée dans un pays endémique du paludisme peut s'expliquer par le respect du programme de lutte contre le paludisme qui prend en compte le diagnostic et le traitement rapide et accéléré des accès palustres, avec le respect de la posologie des médicaments antipaludiques par le malade. Aussi, l'apport considérable de nouveaux antipaludiques efficaces pourrait tendre à diminuer ou à stabiliser la circulation des souches chloroquinorésistantes.

Le taux de 32,5 % de résistance *in vitro*, rapporté dans cette étude ne doit alarmer que s'il se traduit par une résistance *in vivo*. En effet les cas de résistance *in vitro* avec une sensibilité *in vivo* peuvent régler le problème thérapeutique (GUIGUEMDE, 1991).

Néanmoins le test de chimiosensibilité *in vitro* est un test qui permet de suivre l'évolution du *Plasmodium* vis-à-vis des antipaludiques de première intention comme la Chloroquine qui reste l'antipaludique de choix à cause de sa disponibilité, sa moindre toxicité et de son moindre coût. Le test *in vitro* est donc une nécessité dans les zones endémo-épidémiques où le *Plasmodium* devient de plus en plus résistant aux médicaments.

Couplé au test de chimiorésistance *in vivo*, le test *in vitro* permet de mieux appréhender le phénomène de résistance du *Plasmodium*, de contrôler l'endémie palustre en santé publique tant sur le plan de la prophylaxie que celui de la thérapeutique.

En ce qui concerne OLSU, les tests de chimiosensibilité réalisés *in vitro* sur des isolats provenant de malades du paludisme montrent une activité antiplasmodiale évidente sur les formes érythrocytaires du *Plasmodium falciparum* (DJAMAN, 1994). La CI50 qui est le mode d'expression le plus fiable de la chimiosensibilité nous permet de dire que OLSU inhibe autant la maturation des trophozoïtes de *P. falciparum* Chloroquinosensibles que celle des isolats chloroquinorésistants.

Les CI50 de l'ordre de 2 µg/ml observées dans l'action de OLSU aussi bien sur les isolats chloroquinosensibles que chloroquinorésistants suggèrent que la sensibilité des isolats érythrocytaires à OLSU ne dépend pas de leur sensibilité à la Chloroquine. OLSU a donc une activité antiplasmodiale intrinsèque mesurable (DJAMAN, 1994 ; DJAMAN et COLL. 1997 ; DJE et COLL., 1997).

Par ailleurs ces résultats permettent de conclure que le mécanisme d'action de OLSU pourrait être différent de celui de la Chloroquine et qu'il ne peut y avoir de résistance croisée entre ces deux substances. OLSU peut bien être utilisé en cas de résistance à la Chloroquine.

Dans la présente analyse il est trop tôt pour comparer l'importance de l'activité de la chloroquine à celle de OLSU car OLSU n'est qu'un extrait méthanolique qui renferme certainement plusieurs molécules, tandis que la Chloroquine est déjà une molécule pure. Cependant, nous pouvons avancer au vu des résultats préliminaires que la Chloroquine est 16 fois plus active que OLSU sur l'isolat chloroquinorésistant avec des CI50 de 0,09 µg/ml pour la CQ et de 1,5µg/ml pour OLSU sur IS0010i ; l'efficacité de OLSU n'est pas fonction du degré de Chloroquinorésistance des isolats étudiés. Son activité antiplasmodiale *in vitro* justifie l'usage traditionnel de cette Olacacée dans le traitement des accès palustres (BOUQUET et DEBRAY, 1974).

Il est vrai que l'efficacité *in vitro* d'une substance n'augure pas de son efficacité *in vivo*, car il a été prouvé que des substances consommées par voie orale sont le plus souvent métabolisées au niveau du foie avant d'atteindre leur cible. C'est le cas du Proguanil et de la Chloroquine.

En effet le Proguanil n'a aucune activité antiplasmodiale en tant que tel, mais son métabolisme au niveau du foie donne un composé actif, le cycloguanil qui, lui, est actif sur les formes exoérythrocytaires et érythrocytaires de *P. falciparum* (RINGWARD, 1991).

La Chloroquine produit aussi plusieurs métabolites qui ont différentes activités antiplasmodiales (GASQUET ET COLL., 1987).

Mais dans le cas de OLSU, compte tenu de l'efficacité de son utilisation traditionnelle, nous pouvons nous attendre à une meilleure efficacité *in vivo* qui confirmerait les résultats *in vitro*, dans les limites des doses thérapeutiques.

3-

**ACTION SYNERGIQUE DE OLSU SUR L'ACTIVITE
ANTIPLASMODIALE DE LA CHLOROQUINE**

Les isobogrammes réalisés à partir de l'étude des variations de la CI50 de la Chloroquine associé à OLSU présentent l'allure concave des courbes qui se rapprochent de l'origine des axes. Ceci indiquent une synergie d'action dite de potentialisation de la chloroquine par OLSU sur IS002i, 004i (CQS) et 001i (CQR), avec une augmentation dose/effet de l'index de potentialisation (AEI) du pouvoir Schizonticide de la chloroquine. Le plus intéressant dans ce résultat est l'action potentialisatrice de OLSU sur l'efficacité de la Chloroquine vis à vis de

l'isolat chloroquinorésistant ISOO1i dont la CI50 de la CQ est passée de 240 nM à 50 nM. Cet isolat d'abord résistant à la CQ, a vu sa CI50 baissée de 79% le rendant du coup chloroquinosensible, il en est de même pour les autres isolats.

Si la chloroquinorésistance est étroitement liée à la réduction de l'accumulation de la chloroquine à l'intérieur des érythrocytes parasités par *P. falciparum*, l'association OLSU/CQ permettrait d'élever la quantité de la CQ à une concentration létale pour le *Plasmodium* dans ces érythrocytes. OLSU redonnerait à la chloroquine son efficacité antipaludique.

A l'heure actuelle, les substances capables de reverser le mécanisme de la résistance à la Chloroquine appartiennent à diverses classes de molécules, ce sont les bloqueurs calciques, les antidépresseurs, les antihistaminiques tricycliques et les anthraquinones. Le stade de nos études ne nous permet pas encore de situer OLSU dans l'une ou l'autre des classes de ces molécules. Néanmoins, OLSU montre une action potentialisatrice de la sensibilité plasmodiale à la CQ dont le mécanisme nous est encore inconnu.

En conclusion, l'étude de l'activité antiplasmodiale de OLSU sur *Plasmodium falciparum* nous a permis de mettre en évidence l'efficacité de cet antipaludique extrait de *Olax Subscorpioïdae*, Oliv. tant sur les isolats chloroquinosensibles que sur ceux qui sont chloroquinorésistants comme déjà étudiés par **DJAMAN et COLL. en 1994**. De nos jours, compte tenu de l'augmentation inexorable de la résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques de référence, c'est la découverte de nouvelles substances ne présentant pas de résistance croisée avec les molécules usuelles qui demeure la nouvelle orientation de la recherche dans la chimiothérapie du paludisme.

Notre programme de recherche sur les antipaludiques naturels (**DJAMAN et COLL. en 1994, 1997 ; DJE et COLL., 1997**) s'inscrit dans la stratégie actuelle de lutte contre le paludisme préconisée par l'**O.M.S. en 1993**. Ainsi, outre le diagnostic, le traitement et le développement de réseaux de surveillance épidémiologique, il s'agit pour les pays endémiques du paludisme comme la Côte d'Ivoire de promouvoir et renforcer les capacités locales en matière de recherches fondamentales et appliquées en liaison avec d'autres programmes de recherches d'intérêt commun. Grâce à de telles collaborations, la pharmacopée traditionnelle chinoise a fait des progrès sensibles qui ont permis la mise sur le marché de dérivés de l'artémisinine. Des molécules comme les quassinoïdes dotées d'une activité antimalariale, faisant espérer un renouvellement de l'arsenal thérapeutique sont également en étude.

Notre étude nous a également permis de montrer que, OLSU réduit la chloroquinorésistance en potentialisant l'action de la Chloroquine. Ce phénomène ouvre la voie à l'utilisation associative de la pharmacopée locale avec des médicaments modernes pour traiter le paludisme.

De tout ce qui précède, il ressort que la médecine traditionnelle africaine doit être davantage explorée et exploitée pour découvrir d'autres plantes antipaludiques et leurs principes actifs.

Au vu des résultats obtenus, il serait intéressant de travailler avec des souches de *Plasmodium berghei* en culture in vivo sur des souris. Ceci nous permettra de mesurer la toxicité de OLSU et de déterminer ces doses thérapeutiques.

V-

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ADJETTEY, T. A. K., 1995 : Contribution à l'étude in vivo de la sensibilité de *P. falciparum* à la chloroquine à la dose de 25 mg/kg dans la commune d'ADZOPE en CI ; Mémoire de Diplôme de biologie Médicale, 157p

AMBROISE-THOMAS, P., PICOT, S., PELLOUX, H., 1992 : La physiopathologie du paludisme, le point actuel, Bull. Soc. Path. Ex 85

AMBROISE-THOMAS, P., 1991 : Physiopathologie, réceptivité, résistance innée, Paludisme, Ellipses/Aupelf, Ed. Marketing/Ellipses, 60-65.

BALLOU, W. R., SHERWOOD J. A., NEVA, F. A., 1987 : Safety and efficacy of recombinant DNA *P. falciparum* sporozoite vaccine, lancet, 854c C, 1277-1281.

BAUDON, D., LOUIS, J. P. GATEFF, C., GUIGUEMDE, T. R., 1988 : Principe de la surveillance épidémiologique de la chimiorésistance de *P. falciparum* aux antipaludéens. Publ. Med. Afr, 91 : 33-38.

BAUDON, D., 1991 : Moyens de lutte et stratégie, Paludisme Ellipses/Aupelf, Ellipses/Aupelf, Ed. Marketing/Ellipses, 198-227

BITONTI, A. J., SJOERDSMA, A., Mc CANN, P. P., KILE, D. E., ODUOLA, A. M. J., ROSSAN, R. N., MILHOUS, W. K., DAVIDSON, D. E., 1988 : Reversal of chloroquine résistance in malaria parasite *P. falciparum* by despramine, Science, 242, 1301-1303.

BOUQUET, A et DEBRAY, M., 1974 : Plantes médicinales de la Côte d'Ivoire, tableaux et documents de l'ORSTOM 32 ORSTOM Paris 131-133

BOURREE, P.,1994 : Le paludisme, Aide mémoire de parasitologie et de pathologie médicale, Ed. Flammarion, Médecine-science , 2è éd. 113-124

BRUCE-CHWATT, L. J., BLACK, R. H., CANFIELD, C. J. CLYDE, D. F., PETERS, W., WERNSDORFER, W. H., 1985 : Chemotherapy du paludisme 2è éd. série monographique, O.M.S., éd. Genève (27) 2, 73-129.

BRYSKIER, A et LABRO, M. T., 1988 : Les antipaludiques d'origine végétale ; Paludisme et médicament , Arnette, 1ère éd. Paris, 101-131.

BRYSKIER, A., LABRO, M. T., 1988 : Les vaccinations, Paludisme et médicaments Arnette, 1ère éd. Paris, 255-273

BURGESS, R. W., BRAY, R. S. 1961 : The effect of single dose of Primaquine on the gametocytes, gametogony and sporogony of *Laverania falciparum*. Bull. Who-24, 451-459.

CAMPBEL, C., PAYNE, D., SCHWARTZ, F. K., KHATIB, O. J., 1985 : Evaluation of amodiaquine treatment of chloroquinoreistance *P.falciparum* malaria in Zanzibar, 1982 AMOR Med. Hyg, 32, 1216-1220.

CARLE, P. R., LOZ, J., ELISSAN, N., GASQUET, M., SANNIER, C., RICHARD, A., TIMON-DAVID, P., 1986 : Activité antiplasmodiale intravectérielle d'un pyréthriinoïde : la deltaméthrine C. R. Acad. SC. Paris, 303 (III), 565-568.

CHARMOT, G., 1987 : La chimiorésistance de *P. falciparum* Bull. SOC. Path Ex., 80, 4411-4413

CHARMOT, G., 1991 : Protocoles thérapeutique du paludisme, Paludisme Ellipses/Aupelf, Ed. Marketing/Ellipses, 168-178

CHEN , G. X. et ZOLG., 1987 : Purification of the bifunctional thymidilate synthetase dihydrofolate reductase complex from the human malaria parasite *P. falciparum*. Mol. Pharmacol., 32, 723-730.

CHEN, C. J., CHNV, J. E., UEDA, K., CLARK, D. P., PASTAN, I., GOTTESMAN, N. M., RONINSON, I. B., 1986 : Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the MDRS (P6 glycoprotein) gene from multidrug resistant human cells, 47, 381-389.

DANIS, M., 1991 : Médecine tropicale, symptomatologie, Paludisme Ellipses/ Aupelf Ed. Marketing/Ellipses, 87-96

DANIS, M., 1991 : Médicaments antipaludiques Paludisme Ellipses/Aupelf Ed. Marketing/Ellipses, 131-145

DAVIDSON, D. E., 1991 : A new generation of antimalaria TDR new march (35), 1, 7

DESJARDINS, R. E., CANFIELD, C. J., HAYNE, J. D., CHULAY, J. D., 1979 : Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semi automated microdilution technique antimicrob. Agents Chemother, 16, (6), 710-718.

DJAMAN, A. J., 1994.: Activité antiplasmodiale de la DEBOLA, un extrait de plante antipaludique ; Mémoire de DEA de Biotechnologie , 30p

DJAMAN, A. J., DJE, M. K., GUEDE-GUINA, F., 1997 : Mise en évidence de l'activité antichloroquinorésistante de OLSU, Rev. Pharm. Méd-Afr. (in press)

DJE, M. K., DJAMAN, A. J., MAZABRAUD, A., GUEDE-GUINA, F., 1997 : Activité antiplasmodiale des alkaloïdes de *Mitragyna ciliata* sur *P. falciparum* chloroquinorésistant, Afr. Bio. Méd. 2 (1) 4-8

FINDLAY, G. M., MAEGRAITH, B. G., MARKSON, K. L., HOLDEN, J. R., 1946 : Investigations in the chemotherapy of malaria in west Africa. Ann. Trop. Med. Parasitol, 40, 358-367.

FITCH, C. D., 1970 : *Plasmodium falciparum* in owl monkeys : drug resistance and chloroquine binding capacity science, 169, 289-290.

FITCH, C. D., 1973 : Chloroquine resistant *P. falciparum* : difference in the handling of 14 C - amodiaquin and 14 C- chloroquine antimicrob. Agents Chemother, 3, (5), 545-548

FITCH, C. D., GONZALEZ, Y., CHEVLI, R., 1975 : Amodiaquine accumulation by mouse erythrocytes infected with Plasmodium berghei. J. Pharmacol. Expt. Ther. 195, 397-403.

FITCH, C. D., 1986 : Antimalarial schizonticides : ferriprotoporphyrin IX interaction hypothesis. parasitology today, 2, 330-331.

FOOTE, S. J., THOMPSON, J. K., COWMAN, A. F., KEMP, D. J 1989 : Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine resistant isolates of *P. falciparum* ; cell, 57, 921-930.

GASQUET, M., ATOUK, A., SAMAT, A., TIMON-DAVID, P., VIALA, A., 1987 : In vitro chemosensitivity of *P. falciparum* to four chloroquine derivatives. Ann. Trop. Med. Parasitol., 81, 355-358

GINSBURG, H., 1988 : Effet of calcium antagonists on malaria susceptibility to Chloroquine. Parasitology today, 4, 209-211.

GOLVAN, Y. J., 1983 : Elément de parasitologie médicale Edition Flammarion Méd.Sci, 4è éd. 275 - 304

GROS, P., CROOP, J., RONINSON, I., VARSHAVSKY, A., HOUSMAN, D. E., 1986

: Isolation and characterization of DNA sequences amplified in multidrug resistant hamster cells proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 337-341

GU, H. M., LÜ, B. F., QU, Z. X., 1980 : Antimalarial activities of 25 derivatives of

artemisinin against Chloroquinoreistant *P. berghei*. Acta Pharmacologica sinica, 1, 48-50.

GUERRA, T., 1977.: The introduction of cinchona in the treatment of malaria. Part I

and II. J. Trop. Med. Hyg, 80, 112-113, 135-139.

GUIGUEMDE, T. R., 1991 : Evaluation de la chimioresistance, Paludisme

Ellipses/Aupelf, Marketing/Ellipses, 193-195.

GUIGUEMDE, T. R., 1991 : Point sur le paludisme, Séminaire de recyclage des

agents de santé, province du Houet, OCCGE Centre Muraz, (281), 1-8

HERRINGTON, D. A., CLYDE, D. F., LOSONSKI, G.,1987 : Safety and

immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against *P. falciparum* sporozoites, Nature, 328, 257-263.

HYDE, J. E., 1989 : Point mutations and pyrimethamine resistance in *P. falciparum*.

Parasitol. Today., 5, 252-255.

HYDE, J. E., 1990 : The dihydrofolate reductase-thymidilate synthetase gene in the drug resistance of malaria parasites. *Pharmac. Ther.*, 48, 45-59.

JEFFERY, G. M., YOUNG, M. D., EYLES, D. E., 1956 : The treatment of *Plasmodium falciparum* infection with Chloroquine, with a note on infectivity to mosquitoes of Primaquine and Pyrimetamine-treated cases. *Am. J. Hyg.*, 64, 1-11

JEREMIC, C. D., JOKIC, A., BEHBUD, A., STEFANOVIC, M., 1973 : A new type of sesquiterpene lactone isolated from *artemisia annua* L. arteannuin B. *tetrahedron Letters*, 32, 3039-3042.

KAN, S. C et SIDDIQUI, W. A., 1979 : Comparative studies on dihydrofolate reductases from *P. falciparum* and *Aotus trivirgatus*. *J. Protozool.*, 26, 660-664.

KONE , M., PENALI, L. K., HOUDIER, M., ASSOUMOU, A., COULIBALY, A., 1990
: Evaluation *in vivo* de la sensibilité de *P. falciparum* à la chloroquine à Abidjan *Bull. SOC. Path. EX.*, 83, 187-192.

KOUA, K. H., 1994 : Mise en évidence de l'activité larvicide de *Persea americana* sur *Anopheles gambia* S. L, un moustique d'importance médicale. Thèse de Doctorat .3^{ème} cycle, univ. Cocody Abidjan (Côte d'Ivoire) 123p

KOUASSI, K., 1992 : Contribution à l'évaluation de la sensibilité de *P. falciparum* à la chloroquine à la dose de 25 mg/kg et 30 mg/kg dans l'agglomération d'Abidjan (C. I.) ; Thèse de Doctorat en Pharmacie UNIV. C.I, 165p.

KROGSTAD, D. J., SCLESINGER, P. H., 1987 : The basis of antimalarial action : non weak base effects of chloroquine on acid vesicle PH Am. J. Trop. Med. Hyg. 36, 213-220.

KROGSTAD, D. J., SCLESINGER, P. H., HERVALDT, B. L., 1988 : Antimalarial agents : mechanism of chloroquine resistance antimicrob. Agents chemother, 32 (6), 799-801.

Le BRAS, J. et DELERON, P., 1983 : In vitro study of drug sensitivity of *P. falciparum* : an evaluation of a new semi-microtest Am. J. Trop. Med. Hyg, 32, 447-451.

Le BRAS, J., ANDRIEU, B., HATIN, I., SAVEL, J., COULAUD, J. P., 1984 : *P. falciparum* , interprétation du semi-microtest de chimiosensibilité *in vitro* par incorporation de 3H- hypoxanthine Path. Biol. 32, (5), 463-466.

Le BRAS, J et SAVEL, J., 1987 : La détermination de la chimiosensibilité de *P. falciparum* : méthodologie et interprétation Ann. Pédiatr. (Paris), 34, (5), 349-356.

Le BRAS, J. et BASCO, L. K., 1991.: Chimioresistance du *Plasmodium*, Paludisme Ellipses/Aupelf , éd., Marketing/Ellipses, 144-167.

Le BRAS, J., BASCO, L. K., CHARMOT, G., 1993 : Les bases de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* et ses différents profils, cahiers santé, 3, 293-301.

Le BRAS, J., 1993., La résistance du *P. falciparum* ; Quinine, la bonne référence pour l'Afrique; Actua Palu, 5, 1-7

Le CORE, J., 1989 : Etude de la sensibilité in vitro de *P. falciparum* aux antimalariques à INSP , conclusion du comité national sur le paludisme (24)/MSP/CCCD, 1, 1-9.

MAGIDSON, O. Y., GRIGOROVSKI, A. M., 1936 : Acridine compounds and their antimalarial action. (note de Mauss I. H. et Mietzsch F). I. chem. Ber., 69 B , 396-401.

MAGIDSON, O. Y., RUBTOV, N. V., 1937 : Quinoline compounds as sources of medicinal products. VI. antimalarial compounds with the side chain in the four positions J. Gen. Chem. (Urss) (Zurnal obscej Khimii), 7, 1896-1908.

MARTIN, S. K., ODUOLA, A. M. J., MILHOUS, W. K., 1987 : Reversal of chloroquine resistance in *P. falciparum* by verapamil, Science, 235, 899-901.

Mc CONKEY et COLL., 1990 : The generation of genetic diversity in malaria parasites. *Annu. Rev. Microbiol.*, 44, 479-498.

MILLER, L. H., DAVID, P. H., HADLEY, T. J., 1985 : Perspective for malaria vaccination. *Philosophical transaction of royal society of London (B) biological sciences.*, 307, 99-115.

MOUCHET, J., 1980 : Lutte contre les vecteurs et nuisance en santé publique. *Encycl. Med. Chir Paris, maladies infectieuses*, 120, 10-13.

MOUCHET, J et CARNEVALE, P., 1991 : Les vecteurs et la transmission : le paludisme Ellipses/Aupelf, Ed. Marketing/Ellipses 35-59

MOUCHET, J., BAUDON, D., CARNEVALE, P., 1991 : Moyens de lutte et stratégie , Ellipses/Aupelf, Ed. Marketing/Ellipses, 198-210.

NUDELMAN,S., RENIA, L., CHAROENVIT, Y., 1989 : Dual role of antiparasite antibodies *journal of immunology*, 143, 996-1000.

O.M.S., 1965 : Séries de rapports techniques, (296), p. 32

O.M.S.,1974 : Matériel de lutte contre les vecteurs O.M.S. éd, Genève, 281p

O.M.S., 1982 Mode d'emploi du nécessaire d'épreuve pour l'évaluation de la réponse de *P. falciparum* à la chloroquine et à la Méfloquine *in vitro*, MAP, 1, 1-10.

O.M.S., 1993 : Paludisme, à l'heure de la nouvelle donne Méd. Digest. xix(2), 21-23

OUEDRAOGO, J. B., GUIGUEMDE, T. R., GBARY, A. R., 1990 : Surveillance passive de la chimiorésistance palustre à Bobo-dioulasso. Med. Afr. Noire, 37 : 259-265.

PARZY, D., RAPHENON, B., MARTET, G., NICHOLAS, P., TOUZE, J. E., BAUDON, D., LACAMUS, J. L., 1990 : Quantitative Buffy coat (QBC) Monofluorokit falciparum test , comparative value in the rapid Diagnosis of malaria Med. Trop. 50, (1),97-101.

PATTAROYO, M. E., AMADOR, R., CLAVIOR, P., 1987 : A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood of *P. falciparum* malaria, Nature, 332, 158-161.

PAYNE, D., 1986 : Aspects pratiques des épreuves *in vivo* de sensibilité des plasmodies humaines aux antipaludiques WHO/MAL/ 82. Genève, Document non publié.

PETERS, W., EKONG, R., ROBINSON, B. L., WARHURST, D .C., PAN, X-Q., 1989
Antihistaminic drugs that reverse chloroquine résistance in *P. falciparum*, lancet, ii,
334-335.

PETERS, W., 1987 : Chemotherapy and drug resistance in malaria. I and II,
academic press London, Orlando , San diego, New York, Austin, Boston, Sydney,
Tokyo, Toronto, p.110.

**PETERSON, D.S., DI SANTI, S. M., POVOA, M., CALVOSA, V. S., DO ROSARIO,
V. E., WELLEMS, T. E., 1991** : Prevalence of dihydrofolate reductase Asn-108
mutation as the basis for pyrimethamine-resistant *falciparum* malaria in the Brazilian,
Amazon. Am. Trop. Med. Hyg. 45, 492-497.

PHILLIPSON, J. D et O'NEIL, M. J., 1985 : Novel antimalarial drugs from plants,
parasitology Today, 2, (12), 355-359.

PINICHPONGSE, S., DOBERSTYN, E. B., GULLEN, J. R., 1980 : An evaluation of
five regimens for the out patients therapy of *falciparum* malaria in Thailand. Bull.
WHO, 60, 907-912.

RIECHMANN, K. H., CAMPBELL, G. H., SAX, L. J., MREMA, J. E.,1978 : Drug
sensitivity of *P. falciparum* : An in vitro microtechnique, Lancet, i, 22-23.

RINGWALD, P., 1991 : Paludrine (Proguanil) : prophylaxie du paludisme. Données actuelles I. C. I.-Pharma, 1, 21-27

RONINSON, I. B., CHIN, J. E., CHOI, K., GROS, P., HOUSMAN, D. E., FOJO, A., SHEN, D. W., GOTTESMAN, M. M., PASTAN, I., 1986 : Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant K. B carcinoma cells, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 4538-4542.

ROSSI, A., 1991 : Prophylaxie du paludisme. Médecine digest XVII Suppl. (3) 17-20.

SANOFI-WINTHROP, (AMO), 1997 : Une nouvelle ressource thérapeutique, paludisme, 1, 1-8

SCHNEIDER, P., 1960 : Le paludisme, les feuillets du praticien, p.198

STRUCHLER, D., 1989 : How much malaria is there world-wide? Parasitol. today 5 : p.39.

TRIGLIA, T., FOOTE, S. J., KEMP, D. J., COWMAN, F. A., 1991 : Amplification of the multidrug resistance gene Pfmdr 1 in *P. falciparum* has arisen as multiple independent events. In molecular and cellular Biology oct. 5244-5250.

VERDIER, F., Le BRAS, J., CLAVIER, F., HATIN, I., BLAYO, M. C., 1985 : Chloroquine uptake by *P. falciparum* infected human erythrocytes during in vitro

culture and its relationship to chloroquine resistance antimicrob. Agents chemother. 27, (4), 561-564.

WARHURST., 1986 : Antimalarial schizonticides : why a permease is necessary parasitology today, 2, (12), 331-334.

WELLEMS, T. E., 1991 : Molecular genetic of drug resistance in *P. falciparum* malaria. Parasitol. Today, 7, 110-112.

WERY, M., 1991 : Diagnostic biologique du paludisme, Paludisme, Ellipses/Aupelf Marketing/Ellipses, 111-127

WILSON, C. M., SERRANO, A. E., WASLEY, A., BOGENSCHUTZ, M. P., SHANKAR, A. H., WIRTH., 1989 : Amplification of a gene related to mammalian mdr gene in drug resistant *P. falciparum*, Science, 244, 1184-1186.

YAYON, A., GINGBURG, H., 1982 : The transport of chloroquine a cross human erythrocyte membranes mediated by a simple symmetric carrier. Biochem. Biophys. Acta. 686, 197-203

RESUME

L'accès palustre dû à *Plasmodium falciparum* demeure une cause importante de mortalité en zone endémique. L'apparition des souches de *P. falciparum* résistantes aux antipaludiques tels que la Chloroquine (CQ), l'Amodiaquine aggrave le pronostic de cette pathologie. L'impact de cette maladie sur la santé publique a encouragé le développement de la recherche et la mise à disposition de nouvelles molécules antipaludiques efficaces. C'est le cas de l'Artemisinine, molécule isolée à partir d'une plante chinoise : l'*Artemisia annua* L.

En Côte d'Ivoire, la médecine traditionnelle dispose de remèdes antipaludiques à base de plantes qui tient ses promesses dans la tradithérapie du paludisme. Il est donc possible d'isoler à partir de ces plantes, des molécules capables d'inhiber la croissance de *P. falciparum* résistant aux antipaludiques usuels.

L'activité antiplasmodiale *in vitro* de la fraction méthanolique de *Olox subscorpioides* (OLSU) a été testée sur les isolats chloroquinorésistants (CQR) et chloroquinosensibles (CQS) de *P. falciparum* maintenus en culture dans un milieu complet (le RPMI 1640) contenant de l'Hépès, du Bicarbonate de sodium et du sérum humain.

Les résultats obtenus montrent une inhibition de la maturation des trophozoïtes de *P. falciparum* CQS et CQR. Ainsi sur l'isolat IS 018i la CQ donne une CI50 de 240 nM ; cet isolat est donc CQR. La CI50 de OLSU sur le même isolat est de $2,6 \pm 0,16 \mu\text{g/ml}$. Quant à l'action sur l'isolat IS 013y, la CQ donne une CI50 de 99 nM, cet isolat est donc CQS et sa sensibilité à OLSU donne une CI50 égale à $3 \pm 0,047 \mu\text{g/ml}$.

Par ailleurs, OLSU potentialise l'effet de la CQ sur les isolats CQS et CQR. Les isobologrammes établis à cet effet présentent tous des courbes aux allures concaves, traduisant l'effet de la potentialisation de la CQ par OLSU. L'intérêt de ces résultats de l'association OLSU/CQ, est l'action potentialisatrice de OLSU sur l'efficacité de la CQ sur les isolats CQR. Ainsi, l'isolat IS 001i CQR a sa CI50 portée à 50 nM soit **79% de sa réduction** après addition de **8 $\mu\text{g/ml}$ de OLSU** le rendant du coups **CQS**. **En conclusion**, nous pouvons dire que OLSU a un réel effet antiplasmodial intrinsèque. Cette activité est indépendante de la sensibilité des isolats à la CQ

Mots clés : *Plasmodium falciparum*, *Olox subscorpioides*, Chloroquinorésistance, Potentialisation