

MINISTRE DE L'EDUCATION
NATIONNALE DE L'ENSEIGNEMENT
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

REPUBLIQUE DU MALI
UN PEUPLE-UN BUT- UNE FOI

SCIENTIFIQUE



ANNEE UNIVERSITAIRE

2019-2020

THEME

**EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DE LA
RESISTANCE DE *PLASMODIUM FALCIPARUM*
AUX ANTIPALUDIQUES EN REPUBLIQUE DU
TCHAD**

THESE PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 21/072020
DEVANT LA FACULTE DE PHARMACIE PAR

M. Bilaly TRAORE

Pour obtenir le grade de DOCTEUR en PHARMACIE

(Diplôme d'Etat)

Jury :

Président : Pr Amagana DOLO

Examineurs : Pr Karim TRAORE

Dr Souleymane DAMA

Co-directeur : Pr Mamadou WELE

Directeur : Pr Abdoulaye A. DJIMDE

Je rends grâce :

A Allah le tout puissant, le miséricordieux, l'omnipotent de m'avoir donné la vie et m'avoir guidé sur le droit chemin et sans qui je ne serai arrivé au bout de ce cycle. Merci DIEU de m'avoir donné la force, le courage, la patience et la santé de mener à bien ce travail.

A mon père Feu Mahamadou TRAORE

En ce moment solennel de ma vie, il me manque des mots pour t'exprimer ma reconnaissance, ma fierté et mon attachement à toi. Ta gentillesse, ta disponibilité et ton esprit de sacrifice m'ont beaucoup marqué. Ton soutien tant matériel que moral ne nous a jamais fait défaut. Que Dieu le tout puissant vous accorde dans son paradis éternel, Amen !

Remerciements

A ma mère Feu Assétou KANGAMA

Vous avez été arrachée très tôt à notre affection. Malgré ce petit temps que nous avons vécu ensemble vous avez été une mère exemplaire. Vous n'avez ménagé aucun effort pour que nous soyons ce que nous sommes aujourd'hui. Malgré ces énormes efforts que vous avez consentis pour notre réussite, vous n'avez pas pu récolter les fruits de la graine que vous avez semée. Nous continuerons à prier pour vous. Dors en paix Maman.

A mes deux mamans :

Vous avez été sans faute pour notre éducation, nous n'avons jamais senti l'absence de notre mère. Nous ne saurons vous remercier assez pour l'amour

que vous portez à vos enfants que nous sommes. Que Dieu vous donne longue vie.

A mes frères et sœurs

Sources perpétuelles d'émotion, d'affection, d'inspiration et d'espoir. Que DIEU puisse raffermir chaque jour nos liens. Considérez ce modeste travail comme une esquisse de chemin que je voudrais vous montrer afin de susciter chez vous beaucoup de courage.

A mes oncles et tantes

Merci de vos efforts constants pour le renforcement des liens entre nos familles. Trouvez ici l'expression de mon profond attachement aux valeurs que vous cultivez. Ce travail est le vôtre.

A mes cousins et cousines

Considérez ce modeste travail comme une esquisse de chemin que je voudrais vous montrer afin de susciter chez vous beaucoup de courage.

A la grande famille TRAORE à BAMAKO et à KITA (ILOU NI KE)

Pour m'avoir assisté avec patience et altruisme. Recevez ici toute notre gratitude et soyez rassurés de mon fidèle attachement

A mes amis Bakary KAMISSOKO, N'Tièkadjè FOMBA, Moctar BOUARE, Ousmane KONATE, Sékou DEMBELE, Adama OUATTARA, Mohamed Ag OYE

Aux Docteurs Souleymane DAMA, Amadou BAMADIO, Moussa DJIMDE, Bakary FOFANA, Nouhoum DIALLO et Aliou TRAORE :

Vous nous avez initié à la biologie moléculaire et contribué à l'analyse statistique des données. Nous avons beaucoup apprécié vos conseils, votre disponibilité, vos qualités humaines, votre modestie, votre rigueur et votre souci de travail bien fait. Votre persévérance et votre amour pour le travail bien fait font de vous des maîtres exemplaires à suivre. Nous vous prions de le croire votre bien dévoué. Recevez ici nos sincères remerciements.

Au corps professoral de la Faculté de Pharmacie, pour la qualité de l'enseignement que nous avons reçu.

Au personnel du Centre de Recherche et de Formation contre le paludisme et du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires, pour votre disponibilité et votre franche collaboration.

A nos maîtres du Centre de Recherche et de Formation contre le paludisme et du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires, pour votre engagement et votre souci constant pour une formation de qualité

A l'équipe de l'Unité d'Epidémiologie Moléculaire et de Chimiorésistance du Centre de Recherche et de Formation contre le paludisme et du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires : particulièrement au Professeur Abdoulaye DJIMDE, aux Docteurs, Mamadou TEKETE, Bakary FOFANA, Hama MAIGA, Bakary SIDIBE, Oumar SANGARE, Dinkorma OUOLOGUEM, Aminatou KONE, Souleymane DAMA, Amadou NIANGALY, Nouhoum DIALLO, Antoine DARA, Hamidou NIANGALY, Aly KODIO, Nianwalou DARA, Amadou BAMADIO, Sekou SISSOKO, Diagassan DOUMBIA, Kadiatou HAIDARA, Aliou TRAORE, Fatoumata SOW, Amadou DAO, Fanta SOGORE, Yacouba Nany BARRE, Bintou DIARRA, Bassirou DIAKITE, Sekou TOURE, Kassim SANOGO, Aboubecrin HAIDARA, Siaka TOURE, Salif TOURE, Mme SISSOKO Daoule DIALLO et Mme BATHILY Yaye dite Nah SISSOKO

Pour le soutien dont vous avez fait preuve tout le long des travaux de cette thèse. Elle est la vôtre.

HOMMAGE AUX MEMBRES DU JURY

A notre maître et président de jury

Professeur Amagana DOLO

- Professeur de Parasitologie-Mycologie à la Faculté de Pharmacie (FAPH)
- Directeur de l'École Doctorale des Sciences et Technologies du Mali (EDSTM/USTTB)
- Coordinateur du DES de biologie clinique à la Faculté de Pharmacie (FAPH)
- Chercheur au Malaria Research and Training Center (MRTC)

Cher maître, nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury. Auprès de vous nous avons pu bénéficier d'un enseignement de qualité. Nous avons admiré vos qualités scientifiques et pédagogiques. C'est un immense honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury. Recevez ici cher Maître l'expression de notre profonde reconnaissance.

A notre maître et directeur de thèse

Professeur Abdoulaye A. DJIMDE

- ✓ Professeur titulaire en Parasitologie-Mycologie à la FAPH,
- ✓ Directeur du MRTC Parasitologie
- ✓ Chef de l'Unité d'Epidémiologie Moléculaire et de la Chimiorésistance (MEDRU/MRTC)

- ✓ Directeur du Programme DELGEME
- ✓ Membre de l'académie Africaine des sciences

Cher maître, permettez-nous de vous témoigner notre satisfaction pour l'honneur et le privilège que vous nous avez accordé en acceptant d'encadrer cette thèse. Vos qualités humaines et scientifiques nous ont beaucoup émus tout le long de ce travail.

Vous avez cultivé en nous, le sens du travail bien fait et la rigueur scientifique. Malgré vos multiples occupations vous n'avez pas hésité à donner le meilleur de vous-même pour la réalisation de ce travail. Trouvez ici, cher maître l'expression de notre profonde gratitude et de notre indéfectible attachement.

A notre maitre et co-directeur de thèse

Professeur Mamadou WELE

- ✓ Professeur de Biochimie ISA, FMOS et FST
- ✓ Directeur de l'Institut des sciences appliquées (ISA)
- ✓ Directeur du Centre africain d'excellence en bio-informatique (ACE)

Cher maître, nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant d'encadrer cette thèse. Auprès de vous nous avons pu bénéficier d'un enseignement de qualité. Nous avons admiré vos qualités scientifiques et pédagogiques.

C'est un réel plaisir que vous nous faites en acceptant d'encadrer cette thèse. Recevez ici cher Maître l'expression de notre profonde reconnaissance.

A notre maitre et juge

Docteur Souleymane DAMA

- ✓ Maître-assistant en Parasitologie-Mycologie à la FAPH
- ✓ Spécialiste en Pharmacologie préclinique et clinique
- ✓ Chercheur au MRTC Parasitologie

Cher maître, les mots ne peuvent exprimer avec exactitude notre admiration et notre profond respect en acceptant de juger ce travail. Votre compétence, votre dynamisme, ainsi que vos qualités humaines et professionnelles exemplaires ont toujours suscité notre admiration. Votre courage et votre disponibilité nous ont été d'un grand atout pour la réalisation de ce travail. Qu'ALLAH vous donne santé et longévité afin que plusieurs générations d'apprenants puissent bénéficier la qualité de votre enseignement. Amen !

A notre maitre et juge

Professeur Karim TRAORE

- Maître de Recherche en Parasitologie-Mycologie à la FMOS
- Chercheur au MRTC

- Spécialiste en anthropologie biologique

Cher maitre, nous ne saurons jamais trouver assez de mots pour témoigner notre reconnaissance, non seulement pour l'intérêt que vous portez à ce travail, mais aussi, la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger cette thèse. Veuillez accepter cher maitre, le témoignage de notre profond respect et de notre sincère gratitude.

Liste des sigles

ADN : Acide Désoxyribose Nucléique

AR-L : Artéméther – Luméfantrine

ALT : Alanine-amino -transférase

AS : Artésunate

ASAQ : Artésunate-Amodiaquine

AST : Aspartate-amino-Transferase

ATPase : Adénosine triphosphatase

BB : Bleu de Bromophénol

CI : Concentration Inhibitrice

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CO₂ : Dioxyde de carbone

CPS : Chimio-prévention du Paludisme Saisonnier

CTA : Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine

CYP2C19 : Cytochrome P450 2C19

CYP3A4 : Cytochrome P450 3A4

DEAP : Département d'Épidémiologie des Affections Parasitaires

DHA : Dihydroartémisinine

DHFR : DiHydroFolate Réductase

DHPS : DiHydroPtéroate Synthétase

DNTP : Désoxy Nucléotide Triphosphate

ENIPT: Enquête Nationale sur les Indicateurs du Paludisme au Tchad

FAPH : Faculté de Pharmacie

LAMP : Loop-mediated isothermal Amplification

LAV : Lutte Anti Vectorielle

LDH : Lactate Déshydrogénase

MEDRU : Molecular Epidemiology and Drug Resistance Unit

mg : milligramme

Mg²⁺ : ion magnésium

MgCl₂ : chlorure de magnésium

mm : milli molaire

mm Hg : millimètre de mercure

mmol : milli mole

MRTC : Malaria Research and Training Center

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Pb : Paire de base

PfATPase6 : Adénosine Tri Phosphatase 6 de *Plasmodium falciparum*

PfEMP1 : Proteine-1 Érythrocytaire de Membrane de *Plasmodium falciparum*

Pfcr1 : *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gène

Pfdhfr : *Plasmodium falciparum* Dihydrofolate Reductase gène

Pfdhps : *Plasmodium falciparum* Dihydropteroate Synthétase gène

Pfmdr1: *Plasmodium falciparum* multi-drug resistant gene

PM : Poids Moléculaire

PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme

QBC : Quantitative Buffy Coat

qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction

rpm: rotation par minute

RPMI : Roosevelt Memorial Parc Institute

RSA : Ring Stage survival Assay

SD: Standard Deviation

SERCA: Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺

SNP: Single nucleotide polymorphism

SPAQ: Sulfadoxine-pyriméthamine + Amodiaquine

Taq: *Thermus aquaticus*

TBE: Tris Borate EDTA

TCP : Temps de Clairance Parasitaire

Tmax : Taux maximal

TNF- α : Tumor Necrosis Factor α

TPIg : Traitement Préventif Intermittent au cours de la grossesse

UV : Ultra-violet

μ l: microlitre

μ mol: micromole

Table des matières.....	Pages
1. INTRODUCTION :	1
1.1. Objectif général :	4
1. 2. Objectifs spécifiques :	4
2. GENERALITES SUR LE PALUDISME :	5
2.1. HISTORIQUE :	5
2 .2 .CYCLE BIOLOGIQUE :	6
2.2.1. Phase asexuée (chez l’homme) :	7
2.2.1.2. Phase érythrocytaire : [B].....	8
Figure 1 : Cycle de développement de <i>P. falciparum</i>	9
2.2.2. Sporogonie ou multiplication sexuée (chez le moustique) : [C].	9
2.3. Physiopathologie :	11
2.3.1. Accès palustre non compliqué :	11
2.3.2. Paludisme grave:	11
2.4. Manifestations cliniques:	12
2.4.1. Paludisme de primo-invasion :	12
2.4. 2. Accès de reviviscence :	12
2.4.3. Paludisme viscéral évolutif (PVE):	13
2.4.4. Fièvre Bilieuse Hémoglobinurique (FBH) :	13
2.4.5. Neuropaludisme et les autres formes graves et compliquées :	14
2.5. Diagnostic biologique :	15
2.5.1. Diagnostic indirect:	15
2.5.2. Diagnostic direct:	16
2.6. Stratégies de lutte contre le paludisme au Tchad :	17
2.6.1. Prise en charge des cas du paludisme :	17

2.6.2. Mesures préventives :.....	18
2.7. Antipaludiques :.....	20
2.7.1. Amino-4-quinoléines :.....	20
2.7.2. Amino-alcools:	23
2.7.4. Pipéraquline:.....	30
2.7.5. Pyronaridine:	32
2.7.7. Amino-8 quinoléines :.....	38
2.8. Chimiorésistance.....	39
2.8.1. Résistance aux antipaludiques :.....	39
2. 8. 2. Marqueurs de Résistance aux antipaludiques	42
2.8. 2. 1. Gènes <i>Plasmodium falciparum</i> dihydrofolate réductase (<i>Pfdhfr</i>) et <i>Plasmodium falciparum</i> dihydropteroate synthase (<i>Pfdhps</i>)	42
2.8. 2. 2. <i>Plasmodium falciparum</i> chloroquine resistance transporter gene (<i>Pfcr1</i>)	44
2.8. 2. 3. <i>Plasmodium falciparum</i> multidrug resistant gene (<i>Pfmdr1</i>)	45
2.8. 2. 4. Gène <i>Plasmodium falciparum</i> kelch propeller 13 (<i>PfK13</i>)	45
2.8.3. Méthodes d'évaluation de la chimiorésistance :	46
2.8.4 .1. PCR Conventionnelle ou Classique ou en Point final.....	50
2.8. 4. 2. PCR quantitative.....	51
2.8. 4. 3. séquençage.....	53
2.8. 4. 3. 1. Méthode de Sanger	53
2.8. 4.3.2. Séquençage nouvelle génération (Next Generation Sequencing, NGS)	57
2.8.4.3.3. Southern blot et Northern blot	58
3. METHODOLOGIE.....	59
3. 1. Lieu d'étude	59

3. 2. Choix de sites d'étude.....	61
3. 3. Type d'étude	61
3. 4. Période d'étude	61
3. 5. Population d'étude.....	61
3. 6. Echantillonnage	62
3. 7. Analyse moléculaire :	62
3. 7. 1. Extraction de l'ADN plasmodial.....	63
3. 7. 1. 1. Matériel et réactifs.....	63
3. 7. 1. 2. Mode opératoire	63
3. 8. Diagnostic moléculaire des espèces de Plasmodium au Tchad	64
3. 9. Amplification de l'ADN plasmodial :.....	66
3. 9. 1. Matériels.....	67
3. 9. 2. Préparation des réactifs de PCR.....	67
3. 9. 3. Réactifs pour la révélation.....	69
3. 9. 4. Technique d'amplification	70
3. 9. 4. 1. Détermination des polymorphismes aux codons 51, 59 & 108 (<i>Pfdhfr</i> triple mutant)	70
3. 9. 4. 2. Détermination des mutations ponctuelles aux codons 437 et 540 au niveau de dihydroptéroate synthétase.....	78
3. 9. 4. 3. Détermination du génotype des codons 86 et 76 au niveau de <i>Pfmdr1</i> et <i>Pfcrt</i> respectivement.....	81
3. 9. 4. 4. Analyse des marqueurs de résistance aux dérivés de l'artémisinine PF3D7_1343700 kelch protein K13.....	84
3. 10. Gestion et analyse des données	86
3. 11. Considérations éthiques et déontologiques	86
4. RESULTATS.....	87

4. 1. Diagnostic moléculaire des espèces de plasmodies □	87
4. 2. Prévalence des marqueurs moléculaires de la résistance de <i>P. falciparum</i> à la SP au Tchad.....	88
4. 3. Prévalence des marqueurs moléculaires de la résistance de <i>P. falciparum</i> à l'AQ.....	94
4. 4. Marqueurs moléculaires de la résistance aux dérivés de l'artémisinine	99
5. DISCUSSION	101
6. CONCLUSION.....	106
7. RECOMMANDATIONS	107
8. REFERENCE:	108

Liste des Figures.....	Pages
Figure 1 : Cycle de développement de <i>P. falciparum</i>	9
Figure 2 : structure de la chloroquine	21
Figure 3 : structure de l'amodiaquine	21
Figure 4 : structure de la quinine	23
Figure 5 : structure de la méfloquine.....	24
Figure 6 : structure de l'halofantrine	24
Figure 8 : structure du proguanil	27
Figure 9 : structure de la pyriméthamine	28
Figure 10 : structure de la triméthoprime	28
Figure 11 : structure de la sulfadoxine	29
Figure 13 : structure de la dapsonne	29
Figure 14 : structure de la pipéraquine	30
Figure 15 : structure de la pyronaridine	32
Figure 16 : structure de l'artéméther	34
Figure 17 : structure de l'artésunate	34
Figure 19 : structure de la primaquine	38
Figure 20 : Structure des désoxyribonucléotides (dNTP)	54
Figure 21 : Principe de la méthode de séquençage de Sanger	55
Figure 22 : carte du Tchad représentant les sites d'étude	60
Figure 23 : Prévalence des mutations quintuples en fonction des groupes cibles	93
Figure 24 : Prévalence de l'allèle 76T du gène <i>Pfcrt</i> en fonction des groupes cibles	95
Figure 25 : Prévalence de l'allèle 86Y de <i>Pfmdr1</i> en fonction des groupes cibles	97

Figure 26 : Photo du gel d'électrophorèse du produit de la deuxième PCR du gène K13 propeller.....99

Liste des Tableaux.....	Pages
Tableau I : Répartition des sites par zone d'étude	59
Tableau II : Programme d'amplification de la RT-PCR	66
Tableau III : Mélange réactionnel de la première amplification de <i>Pfdhfr</i> des codons 51 et 59 pour un volume final de 25 µl:	71
Tableau IV : Programme de la première amplification de <i>dhfr</i>	71
Tableau V : Mélange réactionnel de la deuxième amplification des codons 51 et 59 de <i>Pfdhfr</i> pour un volume final de 25 µl.....	73
Tableau VI : Programme de la deuxième amplification des codons 51 et 59 de <i>Pfdhfr</i>	73
Tableau VII : Composition du Mélange réactionnel des codons 51 et 59 de <i>Pfdhfr</i> de la digestion.....	75
Tableau VIII : Prévalence moléculaire des espèces plasmodiales	Erreur ! Signet non défini.
Tableau IX : Prevalence moléculaire des espèces plasmodiales en associations	87
Tableau X : Prévalence de mutations triple (I ₅₁ R ₅₉ N ₁₀₈) sur le gène <i>dhfr</i> (codons 51, 59 & 108) en fonction des groupes cibles.	88
Tableau XI : Prévalence de mutation de la dihydropteroate synthétase du codon 437 au Tchad en fonction des groupes cibles.....	89
Tableau XII : Prévalence de mutation de la dihydropteroate synthétase du codon 540 au Tchad en fonction des groupes cibles.....	90

Tableau XIII : Prévalence de quadruple mutation (I ₅₁ R ₅₉ N ₁₀₈ / G ₄₃₇) (<i>dhfr</i> triple mutant + <i>dhps</i> 437 mutant) en fonction des groupes cibles.	91
Tableau XIV : Prévalence de mutation quintuple (I ₅₁ R ₅₉ N ₁₀₈ /G ₄₃₇ E ₅₄₀) (quadruple mutant + <i>dhps</i> 540 mutant) en fonction des groupes cibles.	92
Tableau XV : Prévalence de mutation de l'allèle 76T du gène <i>Pfcrt</i> dans la population au Tchad en fonction des groupes cibles.	94
Tableau XVI : Prévalence de mutation l'allèle 86Y de <i>Pfmdr1</i> dans la population au Tchad en fonction des groupes cibles.	96
Tableau XVII : Prévalence des mutations croisées du gène <i>Pfcrt</i> & <i>Pfmdr1</i> dans la population au Tchad en fonction des groupes cibles .	98
Tableau XVIII : Distribution du polymorphisme du gène K13 propeller	100

1. INTRODUCTION :

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante due à la présence et à la multiplication dans l'organisme humain d'une ou plusieurs espèces plasmodiales inféodées à l'homme[1]. Il est essentiellement transmis à l'homme par la piqûre infestante d'un moustique culicidé du genre *Anophèles* au moment de son repas sanguin. Seule la femelle, hématophage, transmet la maladie[1]. Elle préfère piquer à partir du coucher du soleil avec un maximum d'activité entre 23 heures et 6 heures du matin. Par ailleurs, il existe d'autres voies plus rares d'infestations telles que la voie sanguine (transfusion sanguine) [2] et fœto-maternelle [3].

Il existe plus de 3000 espèces d'anophèles enregistrées dans le monde[4] .

Six espèces sont inféodées à l'homme. Il s'agit : *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) [5], *Plasmodium malariae* (*P. malariae*) [6], *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) [7], *Plasmodium ovale wallikeri* [8] *Plasmodium ovale curtisi* [9][10], *Plasmodium knowlesi* (*P. knowlesi*) [11].

Depuis des années, des approches diverses et variées ont été mises en place par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et les programmes nationaux de lutte contre le paludisme (PNLP) pour le contrôle, l'élimination et même l'éradication de la maladie. Malgré ces efforts, le paludisme reste encore un problème majeur de santé publique [12]. Selon le dernier rapport de l'organisation mondiale de la santé (OMS) sur le paludisme en 2019, le nombre de cas de paludisme a été évalué à 228 millions en 2018 dans le monde dont 213 millions en Afrique [12]. Le nombre de décès a été estimé à 405000 en 2018 et 380000 en Afrique en 2018 [12]. Ce rapport indique que l'accès et l'utilisation des interventions et outils antipaludiques sont insuffisants [12]. Eliminer le paludisme nécessite des mesures de lutte anti

vectorielle, de diagnostic et de traitement rapides, notamment au niveau des villages [12]. Une partie importante de la population à risque n'est pas protégée, notamment les femmes enceintes et les enfants en Afrique [12].

Les premiers cas de résistance à la chloroquine sont apparus en Asie et en Amérique du Sud puis en Afrique vers les années 1980 [13]. L'une des principales composantes pour la prise en charge des cas, le contrôle et l'élimination du paludisme est le prompt traitement avec des médicaments antipaludiques efficaces. Pour la prévention du paludisme chez la femme enceinte l'OMS recommande le traitement préventif intermittent pendant la grossesse (TPIg) avec la sulfadoxine-pyriméthamine (SP). L'OMS recommande également la chimio prévention du paludisme saisonnier (CPS) avec la sulfadoxine-pyriméthamine + amodiaquine (SPAQ) chez les enfants de moins de 5 ans dans les zones Sahéliennes. Toutes ces deux stratégies sont en vigueur au Tchad. En 2015, selon le rapport d'activités du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) du Tchad, les formations sanitaires ont notifié 1490556 cas de paludisme présumé dont 787033 cas confirmés [14]. Le flux des patients est quasi constant toute l'année avec un accroissement substantiel des cas en août, septembre et octobre, période de haute transmission du paludisme [14]. Le paludisme est donc une maladie qui présente une variation saisonnière.

Comme dans les autres pays d'Afrique, le Tchad a adopté en 2005 une politique nationale de prise en charge du paludisme non compliqué basée sur l'Artésunate-Amodiaquine (ASAQ) et l'Artéméther-Luméfantrine (AL), respectivement comme traitements de première et deuxième intention, et la Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP) en TPI chez la femme enceinte [15].

A l'heure actuelle les données disponibles des tests *in vivo* sur la prévalence des molécules antipaludiques au Tchad ont été rapportées en 2018 par Issa

Mahamat Souleymane et collaborateurs qui était de l'ordre de 3,33% de prévalence de mutation triple [16].

A cause de l'insuffisance des données sur la prévalence des marqueurs moléculaires à l'échelle du pays, le PNLP du Tchad a entrepris une enquête transversale pour la détermination de la prévalence des différents marqueurs moléculaires de la résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'amodiaquine sur l'ensemble du territoire [14]. L'analyse moléculaire des confettis prélevés lors de l'enquête a été confiée à l'Unité d'Epidémiologie Moléculaire et de Chimiorésistance (MEDRU); du Malaria Research and Training Center (MRTC), de la Faculté de Pharmacie de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB) au Mali.

Raisons du choix de MEDRU pour les analyses :

Le MEDRU est une unité qui a été choisi compte tenu son expérience dans les analyses des échantillons de grande taille.

En vue de la mise à échelle nationale de la campagne de Chimio Prévention du paludisme Saisonnier chez les enfants basée sur la Sulfadoxine-Pyriméthamine + Amodiaquine et la Sulfadoxine-Pyriméthamine en Traitement Présomptif Intermittente chez les femmes enceintes au Tchad, le PNLP a initié cette étude pour mesurer la prévalence des marqueurs moléculaires de la résistance à ces antipaludiques.

L'hypothèse de ce travail est que la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance aux médicaments utilisés par les différentes stratégies serait élevée sous la pression médicamenteuse.

Pour vérifier notre hypothèse de travail, nous nous sommes fixés des objectifs suivants :

1.1. Objectif général :

Evaluer la prévalence des marqueurs moléculaires de la résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques usuels au Tchad.

1. 2. Objectifs spécifiques :

- ✓ Déterminer la prévalence moléculaire des espèces de plasmodies
- ✓ Déterminer la prévalence des marqueurs moléculaires de la résistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine pyriméthamine
- ✓ Mesurer la prévalence des marqueurs moléculaires de la résistance de *P. falciparum* à l'amodiaquine
- ✓ Préciser la prévalence des marqueurs moléculaires de la résistance de *P. falciparum* aux dérivés de l'artémisinine

2. GENERALITES SUR LE PALUDISME :

2.1. HISTORIQUE :

Le paludisme fait partie des plus vieilles affections de l'humanité et des indices suggèrent que l'homme préhistorique en était atteint [13]. On trouve ainsi dans les anciens manuscrits chinois et égyptiens, de même que dans la littérature grecque et romaine, des témoignages relatifs aux fièvres épidémiques dont les signes ressemblent beaucoup à ceux du paludisme [13]. C'est en 1717 que Giovanni Lancisi attribue cette maladie aux émanations nocives des marais, d'où le nom malaria, de l'italien « malaria » ou air vicié ; c'est vers 1880 que Docteur Alphonse Laveran, un médecin de l'armée française, fut témoin de l'exflagellation d'un gamétocyte mâle lors de l'observation au microscope d'échantillons de sang de patients impaludés [13]. Deux ans plus tard précisément en 1882 l'hypothèse de la transmission du paludisme par le moustique était déjà émise. Cette hypothèse fut confirmée en 1897 par Ronald Ross qui fit la découverte de l'importance du moustique dans le cycle de vie du paludisme aviaire et décrivit des kystes paludéens dans les parois de l'estomac d'Anophèles [17]. En 1898, Grassi décrivit le cycle de transmission complet du parasite et prouva que le paludisme observé chez l'homme est transmis par des moustiques du genre Anophèles [18]. La nomenclature concernant les différents stades de développement du parasite a été publiée en 1900 par Schaudinn [18]. Successivement, furent mis en évidence les espèces *P. falciparum*; *P. vivax* ; *P. malariae* et *P. ovale* [13][19].

Les dégâts causés par le paludisme pendant la première guerre mondiale ont suscité la recherche et la mise à disposition des molécules antipaludiques telles que les dérivés des amino-8-quinoleines, des amino-9-acridines et des amino-4-quinoleines dont la plus représentative est la chloroquine [20]. La chloroquine a ensuite été largement utilisée aussi bien en traitement curatif qu'en prophylaxie jusqu'à ce que l'OMS ait lancé en 1950 un programme d'éradication du

paludisme à l'échelle mondiale, le monde unit contre le paludisme [13]. La Méfloquine et l'Halofantrine ont été découvertes par l'armée américaine suite à un vaste programme de criblage entrepris après l'échec du programme mondial d'éradication et des nombreux cas de paludisme parmi les troupes Américaines envoyées au Vietnam. C'est ainsi qu'il y a eu le développement de nombreux antipaludiques de synthèses dont les plus connus sont l'amodiaquine, la pyriméthamine, le cycloguanil et le proguanil [21]. L'activité antiplasmodique de l'extrait d'*Artemisia annua* L, dont le principe actif est l'artémisinine a été mis en évidence en 1971 [22]. Ces molécules seront plus tard développées par les firmes pharmaceutiques.

2.2 .CYCLE BIOLOGIQUE :

Ce cycle biologique de *Plasmodium* peut être caractérisé par deux phases (figure 1) : une phase de multiplication asexuée ou schizogonie (comportant une phase hépatique ou exo érythrocytaire et une phase érythrocytaire) se déroulant chez l'homme (hôte intermédiaire) et une phase de différenciation sexuée suivie d'une multiplication asexuée, appelée sporogonie, qui commence chez l'homme par la production de gamétocytes mâles et femelles (gamétogenèse) et qui continue chez le moustique (hôte définitif) par la maturation de ceux-ci en gamètes mâles et femelles.

2.2.1. Phase asexuée (chez l'homme) :

2.2.1.1. Phase hépatique ou exo-érythrocytaire [A]

Cette phase hépatique commence avec la pique de l'anophèle femelle. Le moustique infecté inocule de la salive contenant des sporozoïtes aux tissus sous-cutanés de l'hôte humain. Une fois inoculés, les sporozoïtes développent des mouvements qui leur permettent d'atteindre les capillaires dermiques. Ils traversent alors les couches vasculaires endothéliales pour se retrouver dans la circulation sanguine (Figure 1) [23]. Les sporozoïtes activés entament les phases du cycle dans un état dit de compétence d'infectivité [24]. Les sporozoïtes du sang périphérique atteignent les cellules hépatiques en passant à travers les cellules de Kupffer (CK). Une fois à destination, les sporozoïtes pénètrent dans l'hépatocyte par invagination. La vacuole parasitophore se forme au moment de son entrée dans la cellule hôte. Son rôle est de protéger le parasite du cytosol de l'érythrocyte de l'hôte [25]. Dans le foie, le parasite se multiplie par division cellulaire pendant 7 à 20 jours, ce qui aboutit à la production de dizaines de milliers de mérozoïtes. Après 6 à 10 jours (cas de *P. falciparum*) d'infestation, les hépatocytes éclatent et larguent leur contenu dans le sang périphérique [26]. Cette phase, appelée exo-érythrocytaire ou hépatique, permet aussi au parasite de survivre longtemps dans l'organisme sous une forme dormante (hypnozoïtes), alors qu'il aura disparu du sang. Les mérozoïtes hépatiques atteignent alors la circulation sanguine sous forme de paquets de parasites de taille et de forme variables. L'enveloppe de ces paquets appelée « mérosome » ou « extrusome » est celle d'un hépatocyte nécrosé grâce à laquelle le parasite mime une cellule vivante afin d'être reconnue comme cellule du soi pour échapper aux cellule Natural Killer (CK) [27]. La libération de mérozoïtes hépatocytaires est un processus continue et asynchrone dans le paludisme à *P. falciparum* [28]. Les mérozoïtes libérés après éclatement des corps bleus vont, soit infecter de nouveau d'autres cellules hépatiques, soit infecter les globules rouges pour entamer la phase érythrocytaire.

2.2.1.2. Phase érythrocytaire : [B]

Les mérozoïtes issus des schizontes hépatiques pénètrent ainsi les érythrocytes à l'intérieur desquels ils se multiplient à nouveau (Figure 1), c'est l'invasion [26]. Après l'infestation de l'hématie, le parasite, entouré d'une vacuole parasitophore, se développe en anneau [29], puis en trophozoïte qui digère le contenu de la cellule hôte (Figure 1). A l'intérieur de l'hématie, les mérozoïtes se nourrissent de l'hémoglobine, se transforment en trophozoïtes puis en schizontes et se libèrent ensuite en faisant éclater les hématies. Ce sont ces éclatements brutaux et synchrones avec libération de l'hémozoinés (pigment malarique) qui sont à l'origine des accès de fièvre. Les mérozoïtes libérés après éclatement de l'hématie envahissent de nouveaux globules rouges et bouclent ainsi le cycle schizogonique érythrocytaire. Après l'invasion des globules rouges, certains mérozoïtes se séquestrent dans la rate ou la moelle osseuse. Ils se différencient en gamétocytes mâles ou femelles. Cette étape, appelée gamétocytogénèse, se déroule en parallèle du cycle érythrocytaire [30][31]. Chez *P. falciparum* et *P. malariae*, la parasitémie découle de la réactivation de stades érythrocytaires préexistants appelée la récurrence, qui se produit lors du déclin de l'immunité efficace.

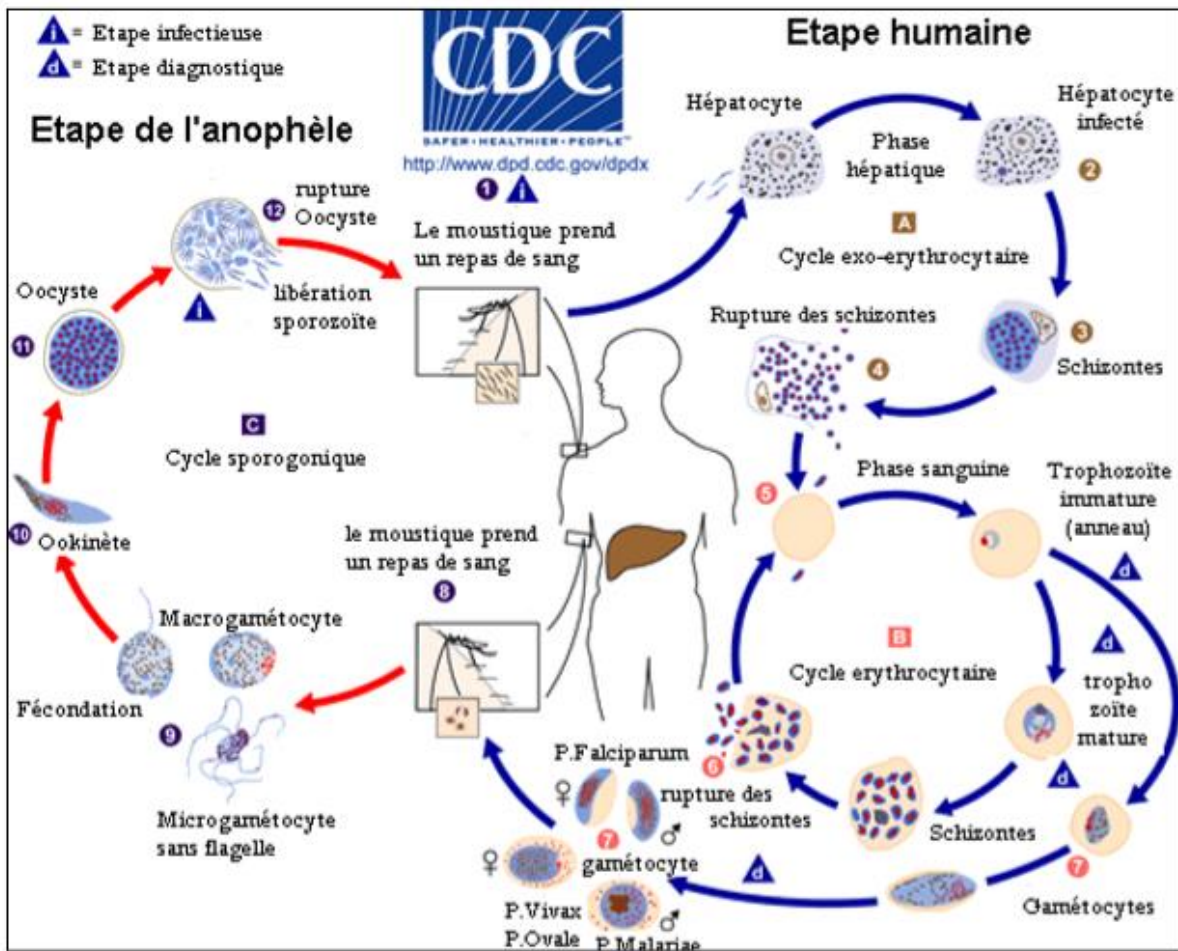


Figure 1 : Cycle de développement de *P. falciparum*

Source: <http://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>,

2.2.2. Sporogonie ou multiplication sexuée (chez le moustique) : [C]

L'anophèle femelle, au cours d'un repas sanguin (chez un sujet infesté porteur de gamétocytes) nécessaire pour la maturation de ses œufs, ingère des trophozoïtes, des schizontes et des gamétocytes. Dans l'estomac du moustique, les trophozoïtes et les schizontes sont digérés tandis que subsistent les gamétocytes qui se transforment en gamètes mâles et femelles (Figure 1). Les gamètes mâles et femelles fusionnent pour former d'abord un zygote (immobile), qui devient un œuf mobile, l'ookinète [32][33]. L'ookinète migre dans le tube digestif du moustique et se fixe à la paroi de l'estomac. Dans les heures qui

suivent sa formation, l'ookinète diploïde devient à la suite d'une méiose [34][35][36] un oocyste haploïde, immobile et arrondi. A l'intérieur de l'oocyste, surviennent des divisions mitotiques successives qui aboutissent à la formation de milliers de sporozoïtes haploïdes [37]. L'oocyste mature est appelé sporocyste. Le sporocyste va éclater et libérer les sporozoïtes. Ces derniers regagnent avec prédilection les glandes salivaires de l'anophèle. Après maturation des sporozoïtes par l'expression différenciée de certains gènes, le moustique devient alors infectieux et reste dans cet état pendant environ un mois [38]. Dans l'hypothèse où le moustique ingérait du sang contenant des gamétocytes d'un seul clone, il y aurait fécondation entre gamètes génétiquement identiques, avec production de zygotes homozygotes pour tous les gènes. Si des gamétocytes de plusieurs clones sont absorbés, des croisements entre des clones génétiquement différents peuvent survenir et être à l'origine de polymorphisme. La reproduction sexuée assure donc un brassage génétique important : constitution de nouveaux individus (génotypes), génération de nouvelles associations chromosomiques («crossing-over» et création de nouveaux allèles par recombinaison intra génique). La durée du cycle sporogonique varie de 10 à 40 jours et est fonction de la température et l'espèce plasmodiale. D'une manière générale, en dessous de 16°C, le cycle sporogonique ne peut s'accomplir. Les conditions optimales sont, une température de 20°C à 30°C et une humidité d'au moins 60% [39].

2.3. Physiopathologie :

2.3.1. Accès palustre non compliqué :

Une fois que les hématies parasitées s'éclatent, les pigments malariques appelés hémozoïnes, sont libérés puis ils agissent sur le centre bulbaire de la thermorégulation et provoquent la fièvre. Chez le malade le cycle endoérythrocytaire se synchronise et libère les pigments malariques et est régulièrement répété. Ce phénomène confère ainsi à l'accès palustre sa périodicité. L'hépatomégalie et la splénomégalie surviennent suite à une hyperactivité du système des phagocytes mononuclés chargés de débarrasser l'organisme des pigments malariques et des débris érythrocytaires.

2.3.2. Paludisme grave:

Les stades asexués de *P. falciparum* sont ancrés dans les microcapillaires des organes nobles (cerveau, poumon, cœur) [40]. Cette séquestration se fait après interaction entre la protéine 1 de la membrane érythrocytaire du *P. falciparum* appelée *Pfemp-1* (*P. falciparum* érythrocyte membrane Protein1) et les différents récepteurs présents à la surface de l'endothélium vasculaire. Ce phénomène est appelé cytoadhérence. Cependant d'autres hypothèses ont été évoquées pour expliquer la physiopathologie du paludisme grave :

- Sécrétion de cytokines pro-inflammatoires : $\text{INF-}\gamma$ et $\text{TNF-}\alpha$.
- Augmentation de la perméabilité de la barrière méningée entraînant une fuite du liquide céphalorachidien et un œdème cérébral.
- Coagulation intra-vasculaire disséminée.
- Phénomène immuno-pathologique avec dépôt de complexes immuns.

Quel que soit le mécanisme, le ralentissement du flux capillaire intracérébral provoque l'anorexie, voire tardivement une ischémie responsable d'une

hémorragie péri-vasculaire et de lésion de la substance blanche qui ne sont pas sans séquelles.

2.4. Manifestations cliniques:

Les manifestations cliniques du paludisme sont exclusivement liées à la schizogonie endo-érythrocytaire. Les principaux signes que sont la fièvre, l'anémie et le sub-ictère sont dus à l'éclatement des hématies et des rosaces avec libération du pigment malarique. L'expression et la gravité de la maladie dépendent du parasite (espèce Plasmodiale et densité parasitaire) et de l'état de prémunition de l'individu. Selon les cas, il est possible de distinguer cinq formes cliniques [41] :

2.4.1. Paludisme de primo-invasion :

Les manifestations après la piqûre infectante est généralement de 11 jours (entre 7 et 14 jours), mais chez le sujet sous chimio-prophylaxie les manifestations peuvent aller jusqu' à un an.

Les manifestations sont :

- fièvre $\geq 39^{\circ}\text{C}$, frissons, sueurs, céphalées, myalgies, malaise général, anorexie
- tableaux trompeurs : fièvre modérée (syndrome grippal), cytopénie isolée chez des sujets suivant une chimioprophylaxie incorrecte.

2.4. 2. Accès de reviviscence :

Ces manifestations interviennent lors de l'acquisition d'un certain degré d'immunité et correspondent aux crises schizogoniques. Ce sont entre autre:

Frissons, chaleur, sueurs, accès se répétant tous les 2 jours : fièvre tierce maligne à *P. falciparum* ou bénigne à *P. vivax*, *P. ovale*, ou tous les 3 jours : fièvre quarte bénigne à *P. malariae*. Ces accès s'accompagnent d'une splénomégalie. La splénomégalie est le témoin de la prémunition, sa présence et son degré chez

les enfants de moins de 10 ans constituent un des marqueurs du niveau d'endémie palustre (indice splénique).

2.4.3. Paludisme viscéral évolutif (PVE):

Les principales caractéristiques du PVE sont:

- infections palustres répétées,
- atteinte des enfants de 2 à 5 ans non encore prémunis vivant en zones d'endémie, expatriés dans des zones où existent des souches chloroquino-résistantes,
- anémie, cytopénie,
- fièvre modérée et intermittente,
- splénomégalie constante, modérée,
- recherche d'hématozoaires positive par intermittence avec parasitémie faible,
- sérologie anti palustre : titre des anticorps très élevé (IgG),
- réponse au traitement assez rapide.
- *Plasmodium* en cause : en principe tous, en pratique *P. falciparum*.

2.4.4. Fièvre Bilieuse Hémoglobinurique (FBH) :

La FBH est une réaction immuno-allergique dont le début est brutal et qui provoque une hémolyse intra-vasculaire.

Bien connue avant 1950, en rapport avec les prises de quinine dans une zone d'endémie à *P. falciparum*, la FBH a resurgi au cours de ces dernières années. Les cas sont toujours observés avec la quinine, mais aussi avec des molécules de structure chimique apparentée (halofantrine) [42]. L'importance d'une polymédication associant 2 ou plusieurs antipaludiques est soulignée. La FBH associe :

- fièvre élevée + hémoglobinurie macroscopique (urines couleur porto) due à une hémolyse intravasculaire aiguë,
- choc, anémie aiguë, insuffisance rénale aiguë (IRA),
- pronostic sévère : mortalité de l'ordre de 20%, morbidité élevée : 90% des patients présentent une IRA nécessitant dans un cas sur deux une épuration extra-rénale,
- diagnostic différentiel avec l'hémolyse aiguë associée à une forte parasitémie au cours d'un paludisme grave et avec l'hémolyse médicamenteuse (amino-8-quinoléines, sulfamides et sulfones en cas de déficit en G6PD) [42].

La Fièvre Bilieuse Hémoglobinurique est une contre-indication absolue à l'emploi d'amino-alcools. Le Paludisme Viscérale Evolutif (PVE) et la Fièvre Bilieuse Hémoglobinurique (FBH) sont des formes sévères du paludisme à *P. falciparum*, mais restent classés en dehors des accès palustres graves.

2.4.5. Neuropaludisme et les autres formes graves et compliquées :

C'est le paludisme des sujets non immun (nourrisson, femme enceinte, enfant, migrants venant d'une zone non impaludée). Ces formes sont l'apanage de *P. falciparum* et sans traitement ils peuvent conduire à la mort au bout de 72 heures.

Les critères de paludisme grave ont été actualisés par l'OMS en 2000. Ces critères sont les mêmes chez l'adulte et chez l'enfant[43].

- Neuropaludisme (score de Glasgow < 9, score de Blantyre \leq 2),
- Convulsions répétées (> 1/ 24 heures),
- Prostration,
- Syndrome de détresse respiratoire,

- Ictère (clinique),
- Acidose métabolique (bicarbonates plasmatiques < 15 mmol/L),
- Anémie grave (Hb < 5 g/dl ou Ht $< 15\%$),
- Hyperparasitémie ($> 4\%$ chez le sujet non immun ou $> 20\%$ chez le sujet immun),
- Hypoglycémie ($< 2,2$ mmol/L),
- Hémoglobinurie macroscopique,
- Insuffisance rénale :
 - Adulte : diurèse < 400 mL /24h ou créatininémie > 265 μ mol/L
 - Enfant : diurèse < 12 mL/kg/24h ou créatininémie élevée pour l'âge collapsus circulatoire (TAS < 80 mm Hg après 5 ans),
- Hémorragie anormale,
- Oedème pulmonaire (radiologique).

2.5. Diagnostic biologique :

Le diagnostic du paludisme est d'abord clinique puis confirmé par un diagnostic biologique. La confirmation du diagnostic clinique par un examen biologique permet de réduire l'utilisation des antipaludiques dans le traitement injustifié pour des fièvres non palustres[44]. En effet la mise en œuvre des programmes de lutte contre le paludisme intègre la recherche d'un diagnostic précoce et d'un traitement efficace. Le diagnostic du paludisme comprend les techniques de diagnostic indirect et direct :

2.5.1. Diagnostic indirect:

Les techniques de diagnostic indirect consistent à rechercher des anticorps dans le sérum ou le plasma. La technique par ELISA n'a pas de place pour le

diagnostic des accès palustres sur le terrain : elle ne permet pas de différencier une infection palustre en cours d'un paludisme antérieur. Elle permet un diagnostic rétrospectif du paludisme chez un sujet non immun[45].

Elle a trois indications : étude d'une fièvre prolongée hors zone d'endémie, dépistage chez les donneurs de sang, études épidémiologiques. Le diagnostic précoce du paludisme est essentiel pour la mise en œuvre d'un traitement précoce, afin de réduire l'intensité de la maladie et d'éviter le décès. L'OMS recommande que tous les cas présumés de paludisme soient confirmés par microscopie ou par test de diagnostic rapide avant d'administrer un traitement. La confirmation parasitologique doit être obtenue en moins de 30 minutes, le frottis permet l'identification de l'espèce et le calcul de la parasitémie, mais il ne peut pas être pratiqué partout.

2.5.2. Diagnostic direct:

Les techniques de diagnostic direct sont[46] :

- **Techniques microscopiques conventionnelles, frottis mince, goutte épaisse.**

Elles nécessitent une méthodologie simple, mais précise et rigoureuse et un long apprentissage.

➤ Frottis mince :

C'est un examen de concentration différentiel rapide qui permet :

- l'étude morphologique des hématozoaires,
- le diagnostic différentiel entre les espèces *Plasmodiales* reste toujours un défi même pour un lecteur averti.

La sensibilité du frottis mince est entre 100-200 hématies parasitées/ μ l [47]

➤ Goutte épaisse :

C'est un test de diagnostic de l'OMS, et qui est largement utilisée pour le diagnostic de routine. Sa sensibilité (seuil de détection d'hématies parasitées/ μL) est de 20 hématies parasitées/ μL , 10 fois plus élevée que celle du frottis mince (100 à 200 parasites/ μL) [46].

- **Technique microscopique par fluorescence :**

C'est une technique permettant la coloration fluorescente des acides nucléiques par l'acridine orange : le malaria-test QBC (quantitative buffy-coat). Cette technique nécessite un équipement particulier. Sa sensibilité est de 5 hématies parasitées/ μL .

- **Détection des antigènes du paludisme par immuno chromatographie : les tests de diagnostic rapide (TDR).**

Plusieurs TDR par immuno chromatographie sont disponibles, classés en fonction du nombre d'antigènes détectés. La plupart, à l'exception de la série Optimal, permet la mise en évidence de l'HRP2 (Histidine Rich Protein 2), spécifique de *P. falciparum* ; certains permettent la mise en évidence de la pLDH (*Plasmodium* lactate déshydrogénase) : *Pf* pour *P. falciparum*, *Pv* pour *P. vivax* ; Pan-LDH commune aux quatre espèces plasmodiales. La sensibilité et la spécificité revendiquées par les développeurs de ces tests sont comparables.

2.6. Stratégies de lutte contre le paludisme au Tchad :

2.6.1. Prise en charge des cas du paludisme [48] :

Le Tchad, comme la plupart des pays endémiques, a adhéré en toute responsabilité à l'initiative mondiale « Faire Reculer le Paludisme (FRP2) » lancée en Octobre 1998 par l'OMS, l'UNICEF, le PNUD et la Banque Mondiale. Cette initiative visait à réduire de 50 % la mortalité liée au paludisme d'ici 2010 par rapport à l'an 2000, puis de 30 % en 2015 et de 20 % en 2025 de

telle sorte qu'en 2030, le paludisme puisse cesser d'être un problème majeur de morbidité, de mortalité et de pertes économiques. Selon la stratégie nationale de lutte contre le paludisme 2014-2018, la vision du pays par rapport à la lutte contre le paludisme est de faire du Tchad : « un pays économiquement fort sans risque de mourir du paludisme ». À cet effet, plusieurs actions ont été menées par le gouvernement appuyé par ses partenaires. La prophylaxie (prévention) du paludisme repose sur deux types de mesure : un ensemble de précautions visant à limiter les risques d'infections et la prise préventive de certains médicaments. Les données collectées au cours de l'EDS-MICS 2014-2015, ont permis d'évaluer les proportions de ménages disposant d'une moustiquaire traitée ou non et ceux disposant d'une MII.

2.6.2. Mesures préventives :

La prévention du paludisme pendant la grossesse, la chimio prévention du paludisme saisonnier et la lutte anti vectorielle (LAV) constituent les axes focaux de la lutte contre le paludisme au Mali.

2.6.2.1. Prévention du paludisme pendant la grossesse [48] :

Le Tchad à instaurer la gratuité du traitement du paludisme grave en milieu hospitalier et dans les centres de santé, de la prévention du paludisme chez la femme enceinte par l'administration du Traitement Préventif Intermittent (TPI) à la SP au cours des consultations prénatales et enfin de la démoustication réalisée dans certaines zones de responsabilité pour faire face aux alertes d'épidémie.

2.6.2.2. Chimio prévention du paludisme saisonnier [48] :

La chimio prévention du paludisme saisonnier (CPS) est une nouvelle stratégie pour le contrôle du paludisme chez les enfants impliquant l'administration mensuelle de sulfadoxine-pyriméthamine + amodiaquine (SP+AQ) pour la prévention du paludisme. Elle est plus adaptée à des zones où le paludisme est

saisonnier avec une transmission intense pendant trois ou quatre mois de l'année. Cette CPS concerne les pays pour lesquels la SP et l'AQ conservent leur efficacité contre *P. falciparum*. SP+AQ confère ainsi une protection d'environ quatre semaines, cette protection diminue ensuite nécessitant un renouvellement du traitement chaque mois. La CPS est administrée à la dose de 1/2cp de SP en prise unique et 1/2 Cp de l'AQ en trois jours chez les enfants de 3 -11 mois ; 1 Cp de la SP en prise unique et 1 Cp de l'AQ en trois jours chez les enfants de 12-59 mois.

2.6.2.3. Lutte anti vectorielle [48] :

La Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide (MII) reste l'un des moyens de prévention les plus efficaces Il s'agit notamment de la distribution à grande échelle de Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide à Longue Durée d'Action (MIILDA), de l'adoption du traitement de paludisme simple par les Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA), de l'instauration des tests de diagnostic rapide (TDR) ou de la confirmation biologique des cas, de la chimio prévention du paludisme saisonnière la distribution gratuite des moustiquaires imprégnées d'insecticide à travers ;

- ✓ la consultation prénatale pour la protection des femmes enceintes (CPN+).
- ✓ Le programme élargi de vaccination pour la protection des enfants de moins de 1 an (PEV+) ;
- la promotion de moustiquaires imprégnées d'insecticide à travers le circuit commercial pour la population générale ;
- le traitement ciblé des gîtes larvaires réalisé. La pulvérisation intradomiciliaire avec pour objectif de réduire la population de moustique ;
- la promotion de l'hygiène et de l'assainissement.

2.7. Antipaludiques :

Un antipaludique est un produit naturel ou de synthèse pouvant être administré par voie orale, parentérale ou rectale, à dose unique ou répétée, et qui permet de détruire le *Plasmodium* ou de bloquer sa croissance afin de prévenir ou de guérir le paludisme.

La classification des antipaludiques est pharmacologique et chimique. C'est ainsi qu'on distingue les différents groupes :

- ❖ **Schizonticides** : ils sont actifs sur les schizontes mais inactifs sur les gamètes. Ils sont curatifs des accès palustres, mais n'empêchent pas la transmission de la maladie. Ils comprennent : la quinine, les amino-4 quinoléines, les biguanides et dérivés, les diaminopyrimidines, les sulfamides.
- ❖ **Gamétocytocides** : ils n'ont pas d'action sur les schizontes mais ont un intérêt sur le plan collectif car ils peuvent empêcher la transmission. Ils comprennent les amino-8 quinoléines.
- ❖ D'autre part, certains antibiotiques appartenant à la famille des tétracyclines (Doxycycline) ou des macrolides (érythromycine) sont utilisés en association avec les schizontocides (quinine) permettent de renforcer l'activité antipaludique.

2.7.1. Amino-4-quinoléines :

Les chefs de file sont la chloroquine et l'amodiaquine. Ces molécules ont été synthétisées respectivement en 1938 et 1946. Ces deux molécules sont considérées comme les antipaludiques de choix, elles ont une action schizonticide excellente et demeurent les antipaludiques les plus utilisés jusqu'à l'apparition et l'extension des phénomènes de résistance. La chloroquine n'est plus recommandée dans le traitement du paludisme à *P.falciparum* à cause de la résistance.

2.7.1.1. Structure :

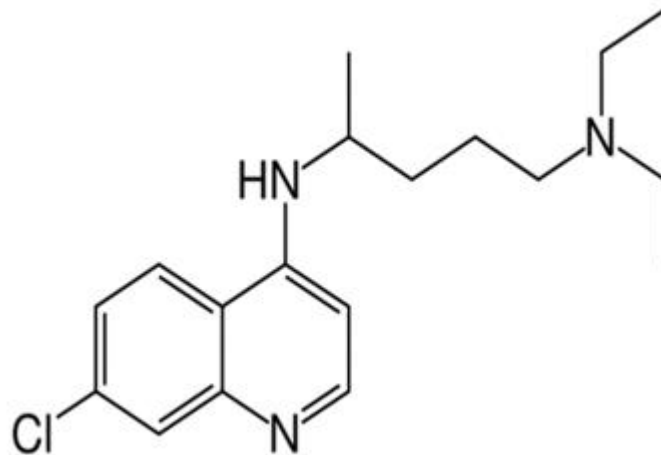


Figure 2 : structure de la chloroquine

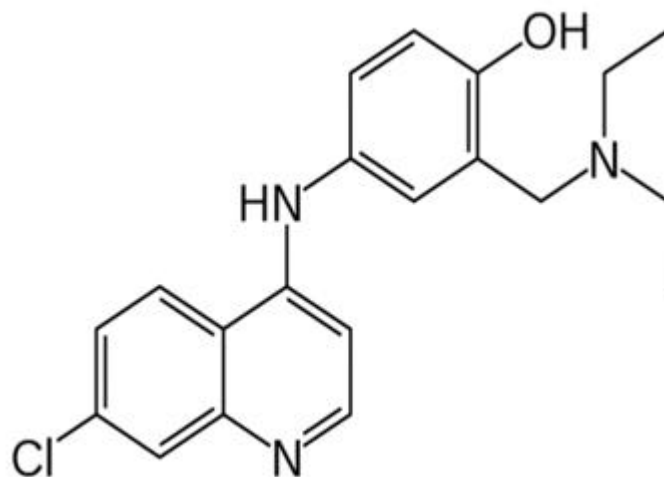


Figure 3 : structure de l'amodiaquine [49]

2.7.1.2. Mécanisme d'action :

Les deux molécules sont des schizonticides de la phase endoérythrocytaire qui se concentrent dans la vacuole digestive du parasite grâce à un gradient de pH pour ensuite inhiber la polymérisation de l'hème qui est toxique pour le parasite.

Ils sont actifs sur les formes asexuées des 4 espèces Plasmodiales, cette activité beaucoup plus spécifique sur *P. falciparum* est due à la présence d'un atome de chlore en position 7 dans leur structure générale. L'amodiaquine provoque moins de prurit et a un goût plus agréable que la chloroquine, mais elle est associée à un risque d'agranulocytose et, dans une moindre mesure, d'hépatite lorsqu'elle est utilisée pour la prophylaxie [50][51].

2.7.1.3. Formulations :

- ✓ La chloroquine (Nivaquine®) existait sous forme : comprimée dosés à 100 et à 300 mg, sirop pédiatrique 5 mg/ml, ampoule injectable dosée à 100 mg IM, posologie OMS 25 mg/kg en 3 jours. J1 et J2 : 10 mg/kg, J3 : 5 mg/kg.
- ✓ L'amodiaquine existe aussi sous forme comprimée contenant 200 mg ou 153,1 mg d'amodiaquine base sous forme de chlorhydrate et comprimée contenant 25 mg/kg et sous forme sirop 10 mg/kg (de 7,5 à 15 mg/kg) de poids corporel d'amodiaquine base une fois par jour pendant 3 jours.

2.7.1.4. Pharmacocinétique :

Grace à ses propriétés de base stable et à son noyau lipophile, la chloroquine diffuse passivement à travers la membrane érythrocytaire puis la membrane de la vacuole parasitophore et la membrane parasitaire pour gagner en fin la vacuole digestive. Tout ceci passe dans un compartiment acide de pH compris entre 4,8 et 5,2 [52].

Après une prise orale, l'absorption est totale et rapide. L'amodiaquine est rapidement métabolisée dans le foie en déséthylamodiaquine, son métabolite actif, qui assure presque complètement l'effet antipaludique [50]. Le pic sérique est atteint entre deux à quatre heures après la prise. Elle se fixe sur les protéines sériques et dans certains tissus (foie, rein, rate, cœur). L'élimination rénale est lente d'où la possibilité de prises espacées.

2.7.2. Amino-alcools:

2.7.2.1. Quinine.

2.7.2.1.1. Structure :

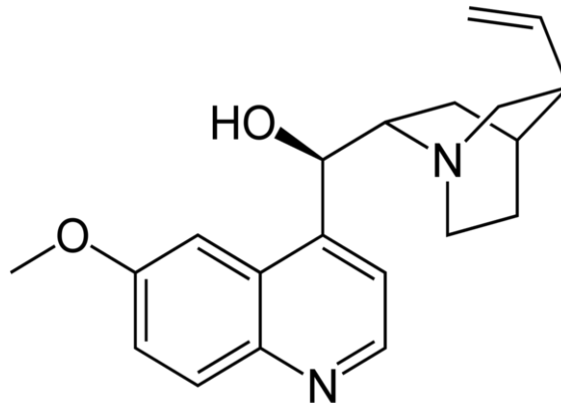


Figure 4 : structure de la quinine [49]

2.7.1.1.2. Mécanisme d'action :

Le mécanisme d'action exact de la quinine garde encore quelques mystères. Ce produit se concentre dans le plasma et se fixe sur les hématies dans lesquelles il pénètre. Il intervient manifestement dans l'hématozoaire en s'intercalant dans l'ADN; mais aussi sur plusieurs sites ce qui expliquerait la rareté des résistances. L'élément actif de la molécule est probablement le noyau benzénique, oxyquinoléique, que l'on retrouve dans les amino-quinoléines. La quinine bloque le cycle schizogonique au niveau des mérozoïtes libres dans le plasma ou encore des trophozoïtes avant leur transformation en schizontes. Elle n'a pas d'action biologique sur les gamétocytes. C'est un produit préconisé dans le traitement des accès palustres même en zone de chloroquino-résistance [53].

2.7.2.1.3. Utilisation :

Elle peut s'utiliser par voie orale ou parentérale (IM ou IV).

2.7.2.2. Quinoléine méthanol et le 9-phénanthrène méthanol :

Les molécules principales sont : la méfloquine, l'halofantrine et la luméfantrine.

2.7.2.2.1. Structure

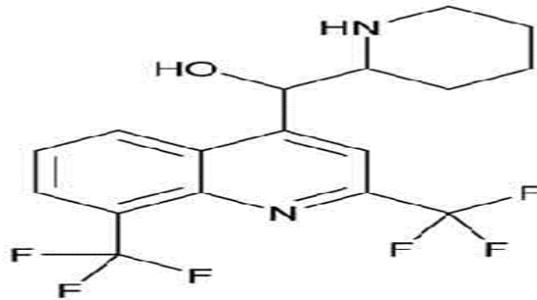


Figure 5 : structure de la méfloquine [49]

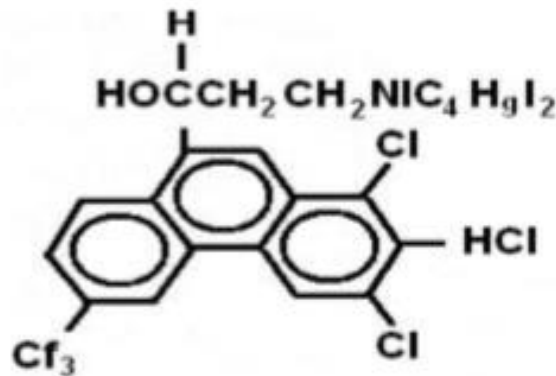


Figure 6 : structure de l'halofantrine [49]

2.7.2.2.2. Mécanisme d'action : méfloquine et halofantrine

Leur mécanisme d'action est très proche de celui de la quinine en se fixant sur des phospholipides de la membrane érythrocytaire, et surtout à la

ferritoporphyrine IX. Des récepteurs communs à la quinine, et sans doute à la chloroquine, pourraient rendre compte de certains retards d'efficacité de la méfloquine ou de l'halofantrine lorsque ces substances ont été préalablement administrées [53].

2.7.2.3. Luméfantrine :

2.7.2.3.1. Structure

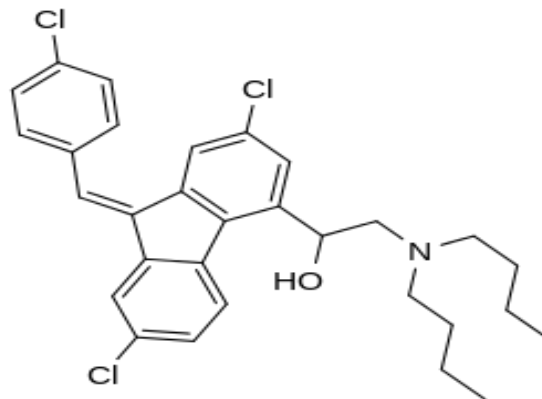


Figure 7 : structure de la luméfantrine [49]

2.7.2.3.2. Mécanisme d'action : luméfantrine

La luméfantrine fait partie des amino-alcools qui sont de très bons schizonticides. Elle interagirait comme les autres amino-alcools avec une protéine membranaire du globule rouge (la stomatine) et serait transférée dans le parasite par une voie de recapture des phospholipides exogènes [50]. Si le mode d'action des amino-4-quinoléines est connu, les bases moléculaires qui sous-tendent l'effet des amino-alcools ne sont pas encore totalement élucidées.

2.7.2.3.3. Formulation :

Uniquement disponible sous forme de préparation orale dans laquelle elle est associée à l'artéméter comprimé contenant 20 mg d'artéméter et 120 mg de luméfantrine et 80mg d'artéméter et 480mg de luméfantrine.

2.7.2.3.4. Pharmacocinétique :

La biodisponibilité orale est variable et hautement dépendante de l'administration concomitante d'aliments gras [50][54][55]. L'absorption augmente de 108% après un repas et est plus lente chez les malades présentant un accès palustre aigu que chez les convalescents. Le pic des concentrations plasmatiques s'observe environ 10 heures après administration. Sa demi-vie d'élimination est d'environ 3 jours.

2.7.2.3.5. Toxicité :

Malgré des similitudes de structure et de propriétés pharmacocinétiques avec l'halofantrine, la luméfántrine n'allonge pas de façon importante l'espace QT et n'a aucune autre toxicité importante [56]. En réalité, ce médicament semble être remarquablement bien toléré. Les effets secondaires signalés sont en général bénins : nausées, inconfort abdominal, céphalées et vertiges et sont impossibles à distinguer des symptômes de l'accès palustre aigu.

2.7.2.3.6. Interactions médicamenteuses :

Le fabricant de l'artéméther-luméfántrine recommande d'éviter l'administration concomitante des substances suivantes : jus de pamplemousse ; anti arythmiques tels que l'amiodarone, le disopyramide, le flécaïnide, le procaïnamide et la quinidine ; antibactériens tels que les macrolides et les quinolones ; tous les antidépresseurs ; antifongiques tels que les imidazolés et triazolés; terfénadine ; autres antipaludiques ; tous les antipsychotiques ; et les bétabloquants tels que le métoprolol et le sotalol.

2.7.3. Anti métabolites :

2.7.3.1. Antifoliniques :

Ils comprennent les biguanides (proguanil) et les diaminopyrimidines ;

3.7.3.1.1. Proguanil :

.7.3.1.1.1. Structure

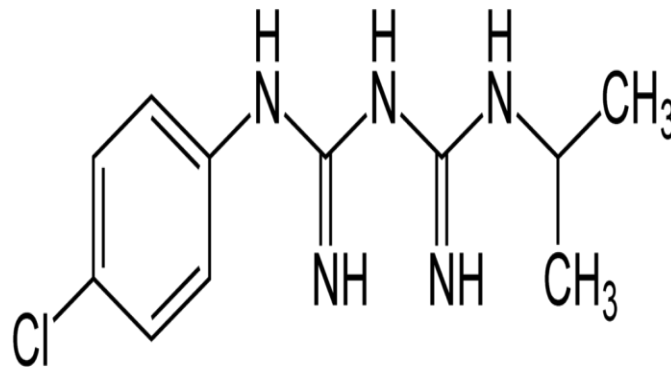


Figure 8 : structure du proguanil [57]

2.7.3.1.1.2. Mécanisme d'action :

Le mécanisme d'action du proguanil ressemble beaucoup à celui des biguanides qui ont une activité schizontocide surtout sur *P. falciparum*, l'action est lente et se fait par inhibition spécifique de la dihydrofolate réductase (DHFR) de l'hématozoaire. La DHFR est une enzyme clé du métabolisme de l'acide folique en acide tétrahydrofolique, facteur essentiel qui intervient dans les réactions de transfert de groupement mono carboné lors de la biosynthèse des purines, pyrimidines et protéines [57].

2.7.3.1.2. Diaminopyrimidines :

Ils sont composés essentiellement de la pyriméthamine et de la triméthoprime.

2.7.3.1.2.1. Structure

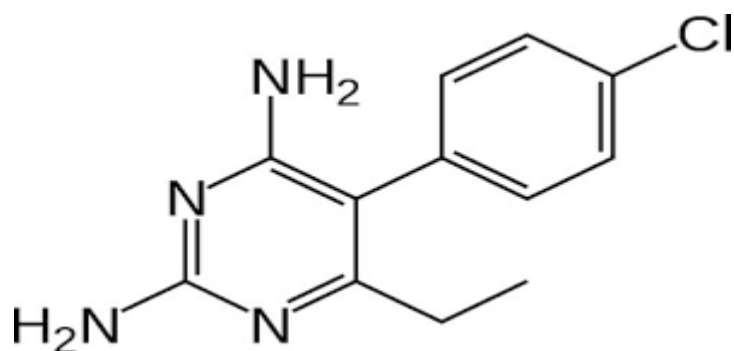


Figure 9 : structure de la pyriméthamine [49]

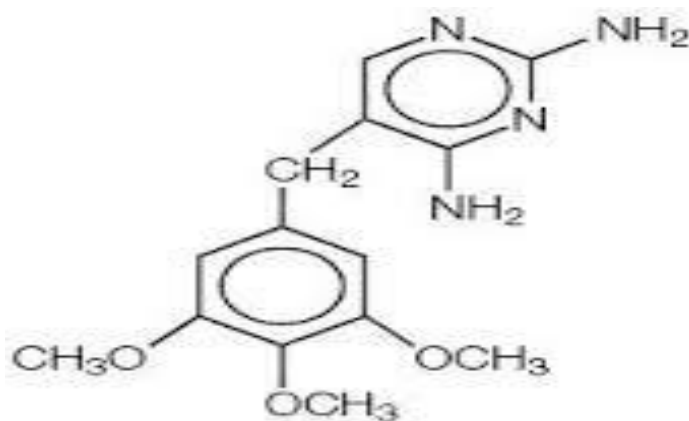


Figure 10 : structure de la triméthoprimine [49]

2.7.3.1.2.2. Mécanisme d'action :

La pyriméthamine a une action schizonticide surtout sur *P. falciparum* mais aussi une action gamétocytocide sur *P. vivax*. Elle a un mécanisme d'action antifolinique sur les hématozoaires mais aussi un peu sur les cellules de l'hôte ce qui explique les effets secondaires. La triméthoprimine a aussi un mécanisme d'action antifolinique (inhibition de la DHFR) mais une activité moindre [53].

2.7.3.2. Antifoliques:

Ils comprennent les sulfamides (sulfadoxine, sulfalène) et les sulfones (dapsone).

2.7.3.2.1. Structure

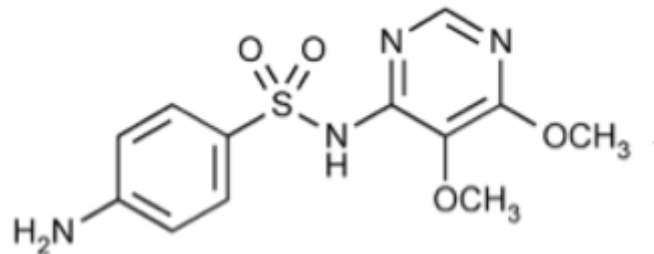


Figure 11 : structure de la sulfadoxine [49]

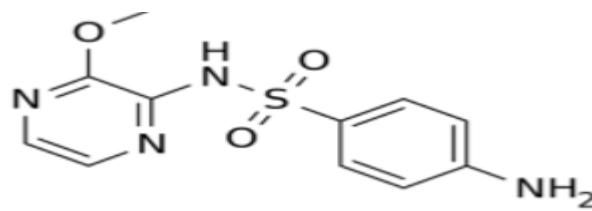


Figure 12 : structure de la sulfalène [49]

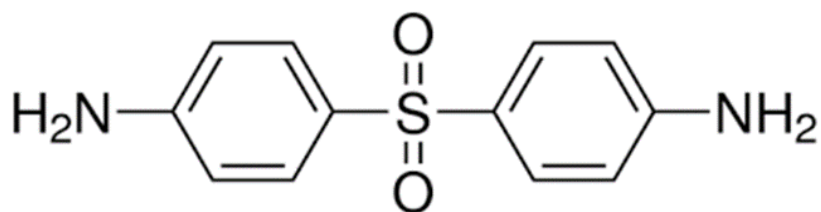


Figure 13 : structure de la dapsone [49]

2.7.3.2.2. Mécanisme d'action :

Leurs mécanismes d'action provoquent le blocage de la synthèse de l'acide dihydrofolique, indispensable à l'édification de l'ADN de l'hématozoaire mais

leur action est lente. Ils sont actifs sur les souches de *P. falciparum* chloroquino résistantes et très peu actifs sur *P. vivax*. On les associe souvent à des inhibiteurs de la dihydro-folate réductase.

2.7.3.2.3. Pharmacocinétique :

La sulfadoxine et la sulfalène sont des sulfamides à longue durée d'action (demi-vie environ 200 heures pour la sulfadoxine et 65 heures pour la sulfalène). Elles sont fortement liées aux protéines plasmatiques et sont essentiellement éliminées par voie urinaire.

2.7.3.2.4. Effets secondaires :

Les effets secondaires sont relativement rares et sont de type d'intolérance sanguine, accidents rénaux ou accidents de sensibilisation (possibilité du syndrome de Lyell avec les sulfamides).

2.7.4. Pipéraquline:

2.7.4.1. Structure

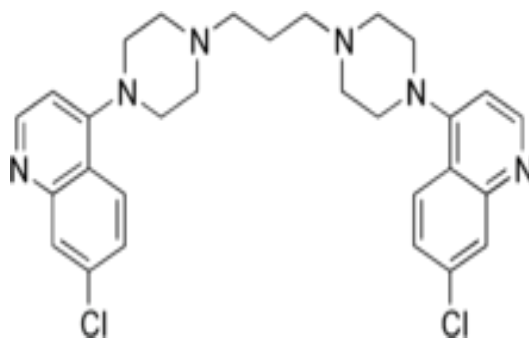


Figure 14 : structure de la pipéraquline [49]

La pipéraquline est une bis quinoléine et cette classe a montré une bonne activité antiparasitaire *in vitro* sur les souches de *Plasmodium* résistantes à la chloroquine. La structure bis quinolone volumineuse peut être importante pour l'activité sur les souches de *P. falciparum* résistantes à la chloroquine.

2.7.4.2. Formulation :

Forme comprimée en combinaison thérapeutique avec la DHA : DHA (20mg)/PQP (160mg) et DHA (40mg) / PQP (320mg).

2.7.4.3. Mécanisme d'action :

La pipéraquline a un mécanisme d'action mal élucidé, mais les hypothèses indiquent que, son mécanisme ressemble à celui de la chloroquine qui est un analogue structurel proche. La pipéraquline pourrait agir par les mécanismes suivants :

- ✓ Inhibition des transporteurs qui assure l'exocytose de la chloroquine à partir des vacuoles digestives du parasite.
- ✓ Inhibition de la dégradation de l'hème dans les vacuoles digestives du parasite.

2.7.4.4. Pharmacocinétique :

La pipéraquline est un composé très lipophile absorbée lentement dans l'organisme. Après administration chez l'homme, le Tmax de la pipéraquline est d'environ 5 heures en fonction de doses uniques et répétées. La pipéraquline a une élimination lente puis s'accumule dans le plasma après des administrations répétées. On observe une élévation de l'effet d'allongement de l'intervalle QT. Elle est liée aux protéines plasmatiques et se métabolise en CYP3A4. La demi-vie d'élimination de la pipéraquline est d'environ 22 jours.

2.7.4.5. Toxicité :

Le risque d'allongement de l'intervalle QTc et de la perturbation de l'ECG peut être observé avec la prise de pipéraquline. La pipéraquline est métabolisée par le CYP3A4 et c'est un inhibiteur de cette enzyme. Les concentrations plasmatiques de la pipéraquline peuvent être augmentées significativement en cas d'administration associée avec d'autres substrats du CYP3A4 (par effet

compétitif) en particulier avec des inhibiteurs de cette enzyme, pouvant majorer l'effet sur l'allongement QTc.

2.7.4.6. Interactions médicamenteuses :

La pipéraquline est contre indiquée chez des personnes recevant d'autres médicaments connus pour prolonger l'intervalle QTc en raison du risque d'interaction pharmacodynamique à l'origine d'un effet additif sur l'intervalle QTc.

2.7.5. Pyronaridine:

2.7.5.1. Structure

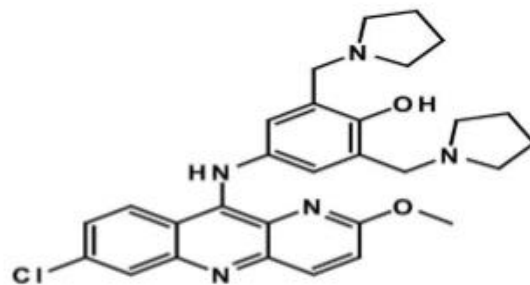


Figure 15 : structure de la pyronaridine [49]

La pyronaridine est le premier dérivé benzonaphthyridine synthétisé en 1970 en chine. Elle a été utilisée en Chine pour le traitement du paludisme en monothérapie pendant 30 ans. Plus récemment l'intérêt accordé à la pyronaridine a été renouvelé comme étant un partenaire possible des dérivés de l'artémisinine dans les CTAs. Elle existe sous la forme base et sel.

2.7.5.2. Mécanisme d'action :

Elle agit par inhibition de la topoisomérase II de l'ADN. L'action se fait au niveau de la vacuole digestive en inhibant la bio cristallisation de l'hème.

2.7.5.2. Formulation :

- ✓ Capsules de 50mg et 100mg.
- ✓ En combinaison thérapeutique: pyronaridine (180mg)/artésunate (60mg).

2.7.5.3. Pharmacocinétique :

L'absorption après administration orale ou intramusculaire de la pyronaridine est rapide et le temps de demi-vie plasmatique après des doses répétées est très élevée [58]. Les concentrations plasmatiques de la pyronaridine sont dose dépendante. La demi-vie d'élimination de la pyronaridine a été estimée à 13,2 jours chez les adultes atteints du paludisme [58] et de 9,6 jours chez les enfants[59].

2.7.5.4. Toxicité :

Des rares cas d'hépto-toxicité ont été décrits avec la pyronaridine chez l'homme. Ainsi une augmentation transitoire de l'alanine amino transférase (ALT) et de l'aspartate amino transferase (AST) ainsi qu'une élévation concomitante de la bilirubine totale ont été associées moins rarement avec l'administration de la pyronaridine. À des doses élevées de pyronaridine une perturbation transitoire de l'ECG a également été signalée. Certains rapports ont fait états de diarrhées, prurits, nausées, douleurs abdominales et céphalées [60].

2.7.5.5. Interactions médicamenteuses :

Elles concernent les médicaments qui perturbent les concentrations des enzymes hépatiques (ALT et AST) et l'ECG [60].

2.7.6. Artémisinine et dérivés:

2.7.6.1. Structure

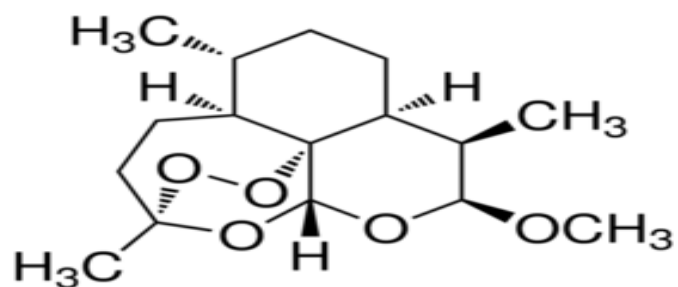


Figure 16 : structure de l'artéméther

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/68827>

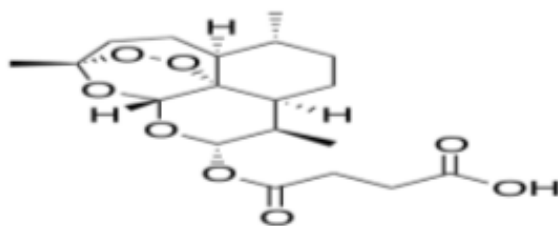


Figure 17 : structure de l'artésunate

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/68827>

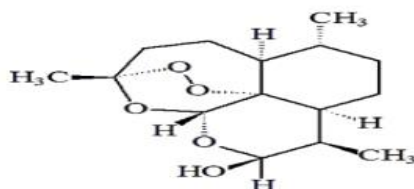


Figure 18 : structure de la dihydroartémisinine

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/68827>

- L'artéméther est un éther méthylique liposoluble de la dihydroartémisinine, qui possède une activité schizontocide très rapide contre les formes sanguines de *P. falciparum* et de *P. vivax*. Après administration intramusculaire, la concentration plasmatique atteint son maximum en six heures environ. Il a été rapporté que l'artéméther élimine la fièvre en 30 à 84 heures dans le paludisme grave à *P. falciparum*.
- L'artésunate injectable est le traitement recommandé par l'OMS pour le paludisme grave à *P. falciparum* chez l'enfant et l'adulte [61]. C'est un médicament dérivé de l'artémisinine. Ce médicament à durée d'action courte tue les parasites plus rapidement que les antipaludiques conventionnels et permet une guérison plus rapide. Artésunate IV reste le traitement d'urgence par excellence de l'accès pernicieux.
- La dihydroartémisinine est le principal métabolite actif des dérivés de l'artémisinine, mais elle peut également être administrée par voie orale et rectale en tant que médicament. Elle est relativement insoluble dans l'eau, et exige une formulation avec les excipients précis pour être suffisamment absorbée. Elle permet d'obtenir des taux de guérison analogues à ceux de l'artésunate par voie orale. Une formulation en doses fixes avec la pipéraquine est actuellement disponible en CTA.

2.7.6.2. Mécanisme d'action de l'artémisinine et ses dérivés:

Ce sont des schizonticides actifs sur les souches de *Plasmodium* résistantes aux autres antipaludéens. L'artémisinine et dérivés sont plus actifs contre le *Plasmodium* que les autres antipaludiques. Leur pont peroxyde intramoléculaire, en présence du fer (Fe), donne des radicaux libres qui détruisent le parasite. Les chélateurs de fer qui pénètrent dans les cellules inhibent l'effet de l'artémisinine et ses dérivés.

2.7.6.2. Formulation :

- Artéméther :
 - Formes injectables dosées à 20 mg Comprimés en combinaison thérapeutique :
 - Artéméther (20mg)/ Luméfantrine (120mg) :
- Artésunate :
 - Comprimés dosés à 50 mg.
 - Poudre pour préparations injectables, 60mg d'artésunate anhydre en ampoules de 1ml + bicarbonate de sodium à 5% en ampoules de 0,6ml.
 - En combinaison thérapeutique : Artésunate-Amodiaquine, Artésunate-Méfloquine.
- Dihydroartémisinine :
 - Comprimés contenant 20mg, 60mg ou 80mg de dihydroartémisinine;
 - Suppositoires contenant 80 mg de dihydroartémisinine.

2.7.6.4. Pharmacocinétique :

- Artéméther : L'absorption orale est rapide, le pic de concentration est obtenu au bout de 2 h, et la fixation aux protéines plasmatiques est de 95%. Il est métabolisé par le CYP3A4 et le CYP2C19 en dihydroartémisinine métabolite actif, puis en métabolites inactifs. Il est éliminé sous formes de métabolites dans les urines et les fèces.
- Artésunate (AS) : L'artésunate est essentiellement administré par voie orale et intraveineuse mais les voies intramusculaire et intra-rectale peuvent également être utilisées. L'AS est une prodrogue rapidement hydrolysée dans la circulation systémique par une estérase mais également via le cytochrome P450 2A6 en dihydroartémisinine (DHA), métabolite actif principalement responsable de l'activité antipaludique

[62]. Après prise orale, l'artésunate est en partie hydrolysé en DHA dans la lumière du tube digestif. La biodisponibilité de la DHA après administration orale est supérieure à 80 % chez des adultes sains ou impaludés. Après administration intraveineuse rapide, le pic de DHA (Tmax) survient de façon variable en fonction des études mais est, en moyenne, toujours inférieur à 25 minutes. Après administration orale d'AS, les concentrations plasmatiques d'AS sont détectables environ 15 minutes après la prise et le pic est observé dans la première heure suivant la prise, témoignant d'une absorption rapide. L'AS et la DHA ne sont pas très fortement liés aux protéines plasmatiques (environ 80 %). La demi-vie d'élimination de l'Artésunate est en moyenne de 15 à 45 minutes selon les études et celle de la DHA de 30 à 100 minutes [63][64].

- Dihydroartémisinine : La dihydroartémisinine est rapidement absorbée après administration orale et les pics de concentrations sont atteints au bout de 2 heures et demie environ. L'absorption par la voie rectale est un peu plus lente, avec des pics de concentrations obtenus environ 4 heures après administration. Près de 55% de la dihydroartémisinine se fixent aux protéines plasmatiques. Sa demi-vie d'élimination est d'environ 45 minutes du fait qu'elle est éliminée par glycuronidation intestinale et hépatique [65].

2.7.6.5. Toxicité des dérivés de l'artémisinine :

L'artémisinine et ses dérivés sont remarquablement bien tolérés [21]. Certains rapports ont fait état de troubles gastro-intestinaux bénins, de vertiges, d'acouphènes, de réticulopénie, de neutropénie, d'une élévation des transaminases hépatiques et d'anomalies électro cardiographiques, notamment de cas de bradycardie et d'allongement de l'espace QT, mais la plupart des études n'ont pas retrouvé de telles anomalies. Le seul effet indésirable potentiellement grave rapporté avec cette classe de médicaments est une réaction

d'hypersensibilité de type 1 chez environ 1 malade sur 3000 [66]. Sa neurotoxicité a été rapportée dans des études chez l'animal, en particulier avec de très fortes doses d'artémotil et d'artéméther administrées par voie intramusculaire, et n'a pas trouvé confirmation chez l'homme [67][68]. De la même façon, des décès d'embryons et des anomalies morphologiques en début de gestation ont été mis en évidence dans des études sur les animaux [69]. L'artémisinine n'a pas été suffisamment évaluée au premier trimestre de la grossesse et doit donc être évitée pendant cette période chez les patientes présentant un paludisme non compliqué.

2.7.7. Amino-8 quinoléines :

Le principal représentant est la primaquine.

2.7.7.1. Structure

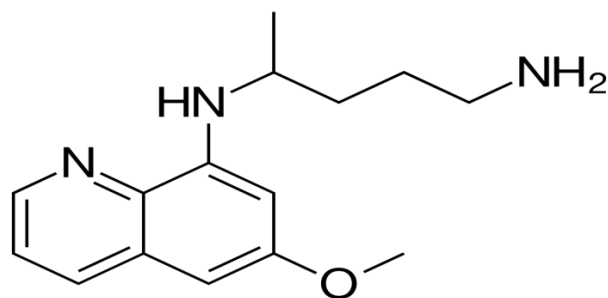


Figure 19 : structure de la primaquine [49]

2.7.7.2. Activité :

La primaquine est active sur les formes sexuées du *Plasmodium* mais aussi sur les sporozoïtes de *P. vivax* et *P. malariae*.

2.7.7.3. Effets secondaires et toxicité :

La primaquine est toxique pour le système nerveux (somnolence anorexie) pour le tube digestif (douleurs abdominales) et pour le sang (déficit en G6PD).

2.8. Chimiorésistance.

La chimiorésistance est définie selon l’OMS, comme étant l’aptitude d’une souche d’hématozoaire à survivre ou à se reproduire malgré l’administration et l’absorption d’un médicament efficace employé à des doses égales ou supérieures aux doses recommandées mais dans les limites de la tolérance du sujet. Pour le cas du paludisme, elle concerne principalement le *P. falciparum*. Plusieurs études ont été menées pour expliquer le mécanisme de la résistance. Comme chez les bactéries, les principaux mécanismes de la résistance pourraient être dus soit à l’inactivation enzymatique ou à la dégradation du médicament, soit à une altération du site de fixation du médicament [70], soit à une inhibition de l’entrée du médicament [71] ou un efflux actif du médicament.

2.8.1. Résistance aux antipaludiques :

La résistance des *Plasmodium* intéresse essentiellement *P. falciparum*, mais des souches de *P. vivax* sont chloroquino-résistantes en Papouasie Nouvelle Guinée, en Asie du sud-est (Birmanie, Vietnam), en Amazonie [72].

- Dès 1957, les premiers cas de résistance à la chloroquine sont apparus en Asie, en Amérique du sud puis en Afrique dans les années 1980. Depuis lors elle touche aujourd'hui la totalité des zones d'endémie palustre.
- **Pour la quinine** : les premiers cas documentés de résistance à la quinine ont été rapportés dans les années 1960 au Brésil et en Asie du sud-est, puis deviennent moins rares depuis les années 1980 en Asie, en Amérique du sud et en Afrique [73].
- **Pour l'amodiaquine** : des résistances croisées à la chloroquine et à l'amodiaquine ont été observées *in vivo* et *in vitro*. Cependant, l'amodiaquine semble plus efficace que la chloroquine, même dans les zones où la résistance à la chloroquine est élevée [46].
- **Pour la méfloquine**, molécule apparue à la fin des années 1970 : il a été observé l'apparition et la propagation de souches résistantes en Asie. Des

résistances à l'association artésunate-méfloquine se sont développées sur le continent asiatique[74].

- **Pour la sulfadoxine-pyriméthamine** : l'efficacité de la pyriméthamine a rapidement diminué en raison du développement rapide d'une résistance du parasite à cette molécule en Afrique de l'est (Kenya, Tanzanie). La pyriméthamine a alors été associée à la sulfadoxine. Il y a quelques années, cette association était encore recommandée dans la plupart des pays africains dans le traitement de l'accès non compliqué à *P. falciparum*. Ensuite y a eu un regain de résistance à l'association sulfadoxine-pyriméthamine en Afrique. Cependant, elle connaît un regain d'intérêt dans le traitement préventif intermittent du paludisme [74].
- **Pour les dérivés de l'artémisinine** : l'artémisinine, connue depuis 2000 ans en Chine, elle a été étudiée en Occident dans les années 1970 et introduite dans la pharmacopée au début des années 1990. Les premiers cas de résistance à l'artémisinine par *P. falciparum* ont été signalés en 2008 dans le Bassin du Mékong en Asie du sud-est [75]. Des souches résistantes ont été découvertes au Cambodge, au Myanmar, en Thaïlande, au Viêt-Nam et au Laos [75]. Pour freiner la propagation de la résistance à l'artémisinine, le Comité de pilotage de la lutte antipaludique de l'OMS s'est fixé comme objectif en septembre 2014 l'élimination du paludisme dans le Bassin du Mékong d'ici 2030 [73].

Les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTAs) sont recommandées par l'OMS pour le traitement du paludisme non compliqué. Elles comportent un médicament d'action rapide et de demi-vie courte (dérivés de l'artémisinine) et un autre médicament partenaire d'action lente et de demi-vie longue. Les associations fixes artésunate + amodiaquine (AS/AQ®), Coarsucam®), artésunate + méfloquine (AS/MQ®), artéméther + luméfantine (Riamet/Coartem®), Pyronaridine/Artésunate (Pyramax®) et

Dihydroartémisinine/Pipéraquline (Eurartesim®/Malacur®) favorisent la compliance du traitement [46].

2.8.1.1. Résistance aux anti-métabolites :

La résistance aux antifoliques est induite par des mutations sur les gènes codant pour la DHFR en position 108 principalement mais aussi en position 51, 59, et 164. Les mutations en position 59 et 108 seraient à l'origine des cas de résistance observés *in vitro* [76][77]. La résistance à la pyriméthamine est due à une substitution de la sérine par l'asparagine en position 108. Les mutations ponctuelles sur le gène codant pour la DHPS, sont les bases moléculaires de la résistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine [78]. Les mutations telles serine-phénylalanine en position 436, alanine-thréonine/sérine en position 613, alanine-glycine en position 581, alanine-glycine en position 437, et lysine-acide glutamique en position 540 ont été impliquées dans la résistance *in vitro* [76].

2.8.1.2. Résistance aux méthanol-quinoléines :

Le gène *Pfmdr-1* a été décrit comme intervenant dans la résistance de *P. falciparum* à cette famille de médicament. En effet les études ont montré une apparente association entre l'augmentation du nombre de copies du gène *Pfmdr-1* et une augmentation de son expression avec une diminution de la sensibilité de *P. falciparum* à la méfloquine et à l'halofantrine [79]. Selon certains auteurs la résistance à l'halofantrine et celle à la méfloquine peuvent apparaître sans une augmentation de l'expression du gène *Pfmdr-1* [79][80]. Une mutation ponctuelle de *Pfcrt* codant pour une protéine transmembranaire, de la vacuole digestive de *P. falciparum* est responsable de la résistance à la chloroquine [81][82]. Une étude réalisée sur le terrain a montré que tous les patients présentant une infection palustre persistante post traitement à la chloroquine présentaient des parasites avec la mutation *Pfcrt* 76T[83].

2.8.1.3. Résistance à la luméfantine :

Des études ont montré que l'augmentation de la prévalence de l'allèle sauvage de *Pfmdr1*86N et *Pfcrt*76K sont associées à une diminution de la sensibilité de la luméfantine [84].

2.8.1.4. Résistance à l'artémisinine et ses dérivés :

Des études ont montré que les dérivés de l'artémisinine agissent par inhibition sélective de la protéine *PfATPase6*, le seul type SERCA Ca^{2+} ATPase dans le génome de *P. falciparum*, semble être la cible principale pour les dérivés d'artémisinine [85][77]. Pour la première fois, l'allèle *PfATP6* 769N, a été associé avec la diminution de la sensibilité à l'artémisinine dans une étude d'efficacité aux CTAs. Par ailleurs, les polymorphismes de *PfK13* ont été associés à une baisse de sensibilité du *P. falciparum* à l'artémisinine en Asie du Sud-Est au Cambodge [86][87].

2. 8. 2. Marqueurs de Résistance aux antipaludiques

2.8. 2. 1. Gènes *Plasmodium falciparum* dihydrofolate réductase (*Pfdhfr*) et *Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthase (*Pfdhps*)

La pyriméthamine se lie et inhibe la dihydrofolate réductase (DHFR), et les sulfamides agissent sur la dihydropteroate synthase (DHPS). L'association de la pyriméthamine et de la sulfadoxine donne une action synergique contre *P. falciparum*[88].

La résistance *in vitro* de *P. falciparum* à la pyriméthamine est due à des mutations ponctuelles spécifiques du gène de la DHFR qui modifient la forme de la cavité de son site actif. Une mutation ponctuelle provoquant un changement de la Serine par l'Asparagine au codon 108 est liée à la résistance à la pyriméthamine. L'ajout de substitution de l'Asparagine par l'Isoleucine au codon 51 et / ou le changement de la Cystéine par l'Arginine au codon 59 confère une résistance à la pyriméthamine de plus haut niveau[89].

La double mutation *Pfdhfr* est la présence simultanée de deux mutations précédemment décrites sur le gène *Pfdhfr*. Dans cette étude, la double mutation *Pfdhfr* constitue la présence simultanée de la mutation aux positions 51, 59 et 108. La substitution de la Serine par la Thréonine au codon 108 couplée à la substitution Alanine par la Valine au codon 16 est associée à une résistance au cycloguanil (le métabolite actif du proguanil, un inhibiteur de DHFR utilisé principalement pour la prophylaxie)[89].

La triple mutation *Pfdhfr* est la présence simultanée de la substitution de Asn-108 plus Ile-51 et Arg-59 (DHFR 108N + 59R + 51I). La substitution de l'Isoleucine par la Leucine à la position 164 combinée à Asn-108 plus Ile-51 et / ou Arg-59 confère une résistance de haut niveau à la fois à la pyriméthamine et au cycloguanil[89].

Aucune mutation du DHFR de *P. falciparum* autre que ces cinq connues pour être associées à la résistance à la pyriméthamine n'a été trouvée dans plusieurs enquêtes antérieures sur des souches provenant d'un large éventail de zones géographiques[90], Bien qu'une mutation de la Valine par la Leucine à la position 140 ait été rapportée dans un seul isolat du Vietnam [91].

Le gène codant pour la DHPS a été séquencé chez *P. falciparum*, et des mutations ponctuelles ont été identifiées comme étant associées à la résistance *in vitro* à la sulfadoxine dans des conditions de test à faible teneur en acide folique. Les mutations associées à une diminution de la sensibilité à la sulfadoxine comprennent la substitution Alanine par la Glycine à la position 581 et la Serine par la Phénylalanine à la position 436 couplées à la substitution de l'Alanine par la Thréonine ou la Serine à la position 613 [92].

La substitution de la Serine par l'Alanine à la position 436 (S436A) et l'Alanine par la Glycine à la position 437 (A437G) n'étaient initialement pas associées à la

résistance, mais plus tard des études ont montré leur implication dans la résistance à la sulfadoxine[93].

La substitution de la lysine par l'acide glutamique à la position 540 (K540E) est aussi associée à la résistance de Plasmodium à la sulfadoxine.

La quadruple mutation se définit comme la présence de la triple mutation *Pfdhfr* (*dhfr* 108N + 59R + 51I) précédemment décrite plus la mutation *Pfdhps* A437G.

La quintuple mutation se définit par la combinaison d'un double mutant *Pfdhps* (A437G + K540E) avec le triple mutant *Pfdhfr*. Ce génotype quintuple mutant est associé à un échec clinique du traitement SP [94][95] [96].

2.8. 2. 2. *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene (*Pfcr*)

Une équipe travaillant sur ce gène a montré qu'une mutation de ce gène codant pour une protéine trans-membranaire (*Pfcr*) de la vacuole digestive de *P. falciparum* est responsable de la résistance à la chloroquine [97].

Certains auteurs ont trouvé des résultats similaires tant *in vitro* qu'*in vivo*[98]. Cette première étude a montré que les souches résistantes d'Asie et d'Afrique ont un haplotype qui diffère de l'haplotype sauvage de la sensibilité à la chloroquine par 7 ou 8 mutations ponctuelles. Une étude réalisée sur terrain et adoptant le protocole de l'OMS 1996 a montré que tous les patients porteurs d'une infection palustre après traitement à la chloroquine présentaient la forme mutée de ce gène[99].

Toutefois on ne connaît pas encore le rôle précis et la fonction jouée par la protéine codée par ce gène, ni le mécanisme par lequel cette protéine confère la résistance à la chloroquine. De nos jours, ce gène est impliqué dans l'efficacité de l'artéméter-luméfantrine et de la dihydroartémisinine [100][101].

2.8. 2. 3. *Plasmodium falciparum* multidrug resistant gene (*Pfmdr1*)

Des homologues du gène *mdr*, responsables de la multi résistance des cellules cancéreuses aux médicaments anticancéreux ont été découverts chez *P. falciparum* et nommés *Pfmdr1* et *Pfmdr2*. Le *Pfmdr2* est localisé sur le chromosome 14 de *P. falciparum*. Les études ont montré qu'il n'était pas impliqué dans la résistance à la chloroquine. Ce gène *Pfmdr2* ne présente pratiquement aucune variation entre les parasites sensibles et ceux résistants à la chloroquine[102]. En revanche des variations dans le nombre de copies du gène *Pfmdr1*, le gène correspondant situé sur le chromosome 5 du parasite, associées ou non à des mutations ponctuelles, ont été initialement considérées dans la chloroquino-résistance. Des mutations ponctuelles de *Pfmdr1* sont liées à la chloroquino-résistance dans certaines études de terrain et *in vitro* [102][103].

Le gène *Pfmdr1* code pour une protéine de perméabilité d'un poids moléculaire de 170kD. Comme les homologues des cellules cancéreuses, cette protéine serait impliquée dans le transport transmembranaire de la chloroquine et d'autres molécules[104]. Une mutation au niveau du *Pfmdr1* Asn-Tyr en position 86 ou une augmentation du nombre de copies aurait un impact sur la modulation de l'efficacité de l'artésunate, l'amodiaquine, l'artéméther et la luméfantine [105][106].

2.8. 2. 4. Gène *Plasmodium falciparum* kelch propeller 13 (*PfK13*)

Le gène K13 code pour une protéine Kelch qui a été associée à une augmentation de la demi-vie de la clairance parasitaire après traitement aux CTAs au Cambodge[86].

Il est localisé sur le chromosome 13 en position 43700 (PF3D7_1343700). Le génome de 2181 pb code pour une protéine de 726 acides aminés. La protéine Kelch se présentant sous forme d'hélice. Le carboxy-terminale du PF3D7_1343700 code pour six motifs kelch répétitifs qui se trouvent dans une grande région avec divers fonctions cellulaires[107]. Il y a une homologie entre

la protéine K13 et la protéine KLHL12 KLHL2 (impliquées dans la dégradation des protéines ubiquitines) et la protéine KEAP1 (impliquée dans l'adaptation de la cellule au stress oxydatif). Plusieurs études ont montré que le gène K13 confère la résistance aux dérivés d'artémisinine, à ce titre il pouvait être considéré comme marqueur moléculaire[108][109]. Contrairement à d'autres auteurs qui n'ont pas trouvé d'association ou de corrélation entre les polymorphismes du gène K13 et le retard de la clairance ou la résistance aux dérivés d'artémisinines [110][111].

2.8.3. Méthodes d'évaluation de la chimiorésistance :

L'évaluation de la chimiorésistance a été standardisée par l'OMS pour l'espèce *P. falciparum*. Il s'agit des épreuves d'évaluation *in vitro* et *in vivo*.

2.8.3.1. Test *in vivo* :

Il consiste à administrer, à un sujet porteur de *P. falciparum*, la dose ordinairement recommandée de l'antipaludique à tester, et à contrôler la parasitémie au bout d'un temps donné. L'évaluation de l'efficacité des schémas thérapeutiques se fait directement avec les tests de l'OMS. Ces tests de l'OMS proposent des suivis de 28 jours pour la chloroquine et l'amodiaquine, 42 jours pour la sulfadoxine-pyriméthamine, l'artéméter-luméfantrine (Coartem®) et le test de 63 jours pour la méfloquine [112]. Le test standard de l'OMS de 28 jours [113][77] consiste à soigner les patients atteints d'infection mono spécifique à *P. falciparum* avec contrôle de la parasitémie aux jours 1, 2, 3, 7, 14, 21 et 28.

2.8.3.1.1. Avantages du test *in vivo* :

- Adhésion facile de la population au protocole d'étude car elle y trouve un intérêt médical immédiat ;
- Réalisation plus simple et aisée (même par un agent de santé de base) ;

- Détermination du niveau de la résistance afin d'adopter un schéma thérapeutique adéquat.

2.8.3.1.2. Inconvénients du test *in vivo* :

- Interprétation difficile des résultats liée aux troubles du métabolisme du médicament, au niveau immunitaire du malade, et aux troubles d'absorption du médicament ;
- Longue durée pour le diagnostic de la résistance.

2.8.3.2. Tests *in vitro* :

Ils consistent à mesurer l'inhibition de la maturation en schizontes des parasites isolés chez un sujet, en présence des doses croissantes d'un antipaludique donné. Après le macro test mis au point par l'OMS et vite abandonné, ce sont les micro tests qui sont actuellement utilisés. On distingue :

2.8.3.2.1. Tests optiques :

Le micro test OMS [114] et le semi-micro test de Le Bras [115] ont été mis au point à la fin des années 70 : ils sont basés sur la capacité des doses croissantes d'antipaludiques testés à empêcher la maturation des trophozoïtes de *P. falciparum* en schizontes, le prélèvement sanguin est mis en culture dans du milieu RPMI (Rostewell Park Memorial Institute) et incubé à 37°C, en présence de CO₂ et de O₂, pendant 24 à 48 heures. Les résultats s'expriment en concentration minimale inhibitrice (CMI) pour le micro test, et en concentration inhibitrice 50% (CI₅₀) ou 90% (CI₉₀), pour le semi-micro test. Parmi les micro tests nous avons le micro test isotopique de Desjardins [116][117] et le semi-micro test de Le bras et Deloron [115] qui sont appelés des tests isotopiques. Ces tests sont des modifications, respectivement, du micro test OMS et du semi-micro test optique. Après 18 heures d'incubation, à chaque cupule un radio-isotope est ajouté (hypo xanthine tritiée). La croissance des parasites est révélée par l'incorporation du radio-isotope dans le noyau des parasites. La mesure de la

radioactivité se fait dans un compteur à scintillation. Les résultats sont donnés en coup par minute et l'activité du médicament est exprimée en CI_{50} ou en CI_{90} .

2.8.3.2.2. Nouveaux tests :

2.8.3.2.1.1. Micro test de Mark II :

C'est une modification de la macro test par les mêmes auteurs qui se sont inspirés de la technique de la culture continue de TRAGER et JENSEN. Il consiste à mettre en culture pendant 24 à 48 heures à 37°C sur des plaques de titration traitées avec différents antipaludiques à doses croissantes. Les kits sont fournis par l'OMS et donnent des doses critiques de sensibilité pour chaque médicament [118].

2.8.3.2.1.2. Test de Makler:

C'est un test enzymatique fondé sur la capacité de l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) de *P. falciparum* à utiliser rapidement la 3-acétylpyridine adénine di nucléotide dans la réaction aboutissant à la formation de pyruvate à partir du L-lactate. Le test vise à détecter et à quantifier, par une technique enzymatique, la LDH produite par *P. falciparum* en présence de l'antipaludique étudié. Il existe une corrélation entre la densité parasitaire et l'activité de la LDH *Plasmodiale* [118].

2.8.3.2.3. Test de Ring Stage Survival Assay (RSA):

Le RSA_{0-3h} fournit une plateforme pour la caractérisation moléculaire de la résistance à l'artémisinine. Le test RSA_{0-3h} peut être mis en œuvre lorsque la surveillance de la résistance à l'artémisinine est nécessaire.

✓ Le test de RSA *in vitro* :

C'est un test qui permet de mesurer le taux de survie des parasites au stade anneau (0-3h et 9- 12h) adaptés à la culture après les avoir exposés à 700 nM de DHA ou 0.1% de diméthylsulfoxyde.

✓ Le test de RSA *ex vivo* :

Les tests RSA *ex vivo* sont faits sur les parasites prélevés chez les patients directement avant d'instaurer le traitement. Il utilise les mêmes procédures que le RSA *in vitro*.

Les tests *in vitro* présentent des avantages et inconvénients :

2.8.3.2.4. Avantages des tests *in vitro* :

- ✓ La possibilité de tester plusieurs antipaludiques sur les mêmes souches Plasmodiales à la fois ;
- ✓ La possibilité de faire un diagnostic beaucoup plus précoce de la résistance ;
- ✓ Pas de problème de biodisponibilité ni de troubles du métabolisme des médicaments ;
- ✓ Pas de problème de disponibilité des patients.

2.8.3.2.5. Inconvénients des tests *in vitro* :

- ✓ Nécessité d'un matériel lourd et d'un personnel qualifié ;
- ✓ Conditions rigoureuses de prélèvement et de culture des parasites très difficile sur le terrain (risque de contamination) ;
- ✓ Difficulté de cultiver certaines souches sauvages ;
- ✓ Incapacité de déterminer les échecs thérapeutiques.

2.8.4. Test moléculaire :

Les tests moléculaires font intervenir essentiellement trois techniques:

Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

2.8.4 .1. PCR Conventiennelle ou Classique ou en Point final

Principe :

Ce sont des techniques qui permettent d'évaluer les mutations du parasite. Il consiste en une amplification exponentielle de l'ADN plasmodial en présence d'une enzyme (Taq polymérase), d'amorces spécifiques et d'un milieu tampon. La révélation se fait par électrophorèse de l'ADN amplifié sur gel d'agarose.

Technique :

Cette technique décrite en 1985 par K. Mullis et al. [119] permet une amplification enzymatique *in vitro* de l'ADN initial. Elle nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent de l'ADN à amplifier. Connaissant ces deux séquences, on synthétisera deux oligonucléotides qui ont deux fonctions. La première étant la reconnaissance de la partie de l'ADN à amplifier et la deuxième, servant d'amorces à la Taq polymérase.

Des cycles successifs sont entrepris, chaque cycle comprenant :

- ✓ Dissociation par la chaleur pour séparer les deux brins de l'ADN.
- ✓ Association avec les deux amorces spécifiques.
- ✓ L'hybridation des amorces aux brins d'ADN est rendue possible grâce à un abaissement de température. Un des deux oligonucléotides se fixe sur un brin de l'ADN, le deuxième sur l'autre.
- ✓ Elongation des amorces avec une ADN polymérase.

Cette technique a eu de l'ampleur avec la découverte d'une ADN polymérase non inactivée par la chaleur dans les années 74 par Air GM et al. , [120] et son utilisation dans l'amplification *in vitro* en 1988 par Innis M et al. , [121]. Il

s'agit de la Taq polymérase (isolée d'une bactérie thermophile adaptée à la vie dans des sources d'eau chaude ("*thermus aquaticus* "). Avec la Taq polymérase on peut effectuer un nouveau cycle (dissociation, Association des amorces, réplication de l'ADN) sans avoir à ajouter chaque fois de l'enzyme. Ces réactions sont maintenant automatisées grâce à des thermocycleurs programmables en température et en temps.

Dans la première génération des tests PCR, dite "PCR Classique" ou "PCR en point final", les produits d'amplification PCR sont analysés au stade terminal du processus analytique. Le contenu des tubes contenant le milieu réactionnel et l'ADN matrice sont déposés sur un gel d'agarose. Si la séquence d'ADN cible a été amplifiée, la quantité d'ADN copiée est en quantité suffisante pour être visualisée, après migration des molécules d'ADN dans un champ électrique, sous la forme d'une fluorescence UV. Cette approche ne permet toutefois d'obtenir que des résultats qualitatifs (réponse présence /absence de la séquence cible).

Cette PCR conventionnelle a été utilisée pour faire l'analyse moléculaire du gène *Pfcrt*, *Pfmdr1*, *Pfdhfr*, *Pfdhps* etc.... Elle a également servi à faire le diagnostic d'espèces plasmodiales des échantillons de cette étude.

2.8. 4. 2. PCR quantitative

La PCR quantitative (ou QPCR), ou PCR en temps réel RT-PCR, est une méthode particulière de réaction en chaîne par polymérase permettant de mesurer la quantité initiale d'ADN. En réalité, la PCR quantitative mesure le nombre d'amplicon (portion d'ADN définie par un couple d'amorces).

À chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN total ou d'amplicon est mesurée grâce à un marqueur fluorescent. L'obtention de la cinétique complète de la réaction de polymérisation permet d'obtenir une quantification absolue de la quantité initiale d'ADN cible, ce qui était très difficile à obtenir sans biais en PCR conventionnelle.

Principe :

Le principe de la PCR en temps réel repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant et non à la fin de la PCR (PCR conventionnelle) ou au cycle $n < 40$ (PCR semi-quantitative).

Techniques :

Des sondes fluorescentes se fixent soit sur l'ADN double brin (technologie SYBR) ou sur une séquence d'ADN précise (technologie Taqman 3 et Beacon). Ces sondes ne fluorescent qu'une fois fixées à l'ADN (soit à cause d'un « quencher » soit car la fluorescence nécessite un ADN double brin). Un seuil de fluorescence est établi par le programme de l'appareil de PCR en temps réel. Une fois que la quantité d'ADN permet aux sondes fluorescentes de dépasser ce seuil alors on obtient un numéro de cycle PCR appelé « Ct » pour « Cycle Threshold » soit « cycle seuil ». C'est cette valeur qui est à la base des calculs pour quantifier l'ADN de façon absolue ou relative. Il est important de connaître l'efficacité E de la PCR. Pour cela, on effectue une PCR en temps réel sur des échantillons de dilution croissante pour obtenir une courbe étalon correspondant au couple d'amorces utilisé (spécifiques du locus d'intérêt). En pratique, le programme de la machine de PCR en temps réel peut calculer l'efficacité E de la réaction. Plus souvent, une PCR en temps réel sur une série de dilution avec une quantité d'ADN initiale connue permet de calculer l'efficacité de la réaction. Les Ct sont placés sur un graphe en échelle logarithmique et l'équation de la régression linéaire passant par ces points donne l'efficacité (c'est le coefficient directeur).

Grâce à l'extraordinaire puissance de la technique d'amplification de l'ADN par PCR, il est possible aujourd'hui d'établir un profil génétique à partir de quantités infimes d'ADN.

NB : Il y a une autre technique de la PCR quantitative, la Réaction de Polymérisation en Chaîne à Transcriptase Inverse appelée en anglais Reverse Transcriptase Polymerase Chain Réaction qui est abrégée par La RT-qPCR est une technique qui permet de faire une PCR (réaction en chaîne par polymérase) quantitative à partir d'un échantillon d'ARN. L'ARN est tout d'abord rétro transcrit grâce à une enzyme appelée transcriptase inverse, qui permet la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc).

2.8. 4. 3. séquençage

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné.

La séquence d'ADN contient l'information nécessaire aux êtres vivants pour survivre et se reproduire. Déterminer cette séquence est donc utile aussi bien pour les recherches visant à savoir comment vivent les organismes que pour des sujets appliqués. En parasitologie, elle peut être utilisée pour identifier, diagnostiquer et potentiellement trouver des traitements à des maladies génétiques. En biologie, l'étude des séquences d'ADN est devenue un outil important pour la classification des espèces. Plusieurs méthodes sont utilisées parmi lesquelles il y a la méthode de Sanger et les méthodes de nouvelles générations.

2.8. 4. 3. 1. Méthode de Sanger

La méthode de Sanger est aussi appelée méthode des didésoxyribonucléotides, inventée il y a une vingtaine d'année dans le laboratoire de Fred Sanger à Cambridge en Grande-Bretagne, est aujourd'hui universellement employée pour séquencer l'ADN. Elle repose sur l'allongement par l'ADN polymérase d'un brin à partir d'une amorce, en utilisant un autre brin d'ADN comme matrice.

Cet allongement est réalisé en présence des quatre désoxyribonucléotides triphosphate (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), monomères utilisés par la

polymérase, et d'un analogue didésoxyribonucléotides (ddNTP, figure 20) qui joue le rôle de terminateur de chaîne.

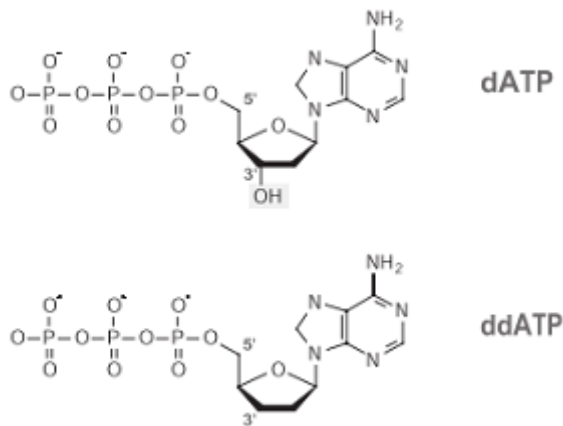


Figure 20 : Structure des désoxyribonucléotides (dNTP)

Dans le didésoxyribonucléotide (ddNTP), le remplacement du groupement 3'OH par un 3'H empêche la formation d'une liaison phosphodiester du côté 3'.

Ces nucléotides modifiés peuvent toutefois être incorporés par l'ADN polymérase car ils possèdent un côté 5'-triphosphate normal (**Figure : 20**).

Les règles d'appariement A-T et G-C sont respectées lors de l'incorporation des ddNTP.

Ainsi le ddNTP sera incorporé lorsqu'on trouvera en regard un T sur le brin matrice

Du fait de l'incorporation spécifique de l'analogie par la polymérase, on obtient un mélange de fragments qui se terminent sélectivement aux positions correspondant au nucléotide choisi (dans la figure : 20).

Le principe de la méthode de séquençage est illustré sur la figure 21 :

On effectue ainsi quatre réactions en parallèle, chacune avec l'un des quatre ddNTP, et l'on sépare les fragments obtenus par électrophorèse. Afin de pouvoir identifier les fragments d'ADN synthétisés par la polymérase et en particulier

pour pouvoir les distinguer de l'ADN matrice, on les marque avec un traceur fluorescent. Celui-ci est accroché à l'une de ses deux extrémités, soit en 5', sur l'amorce de séquençage, soit en 3' sur le didésoxyribonucléotide terminateur.

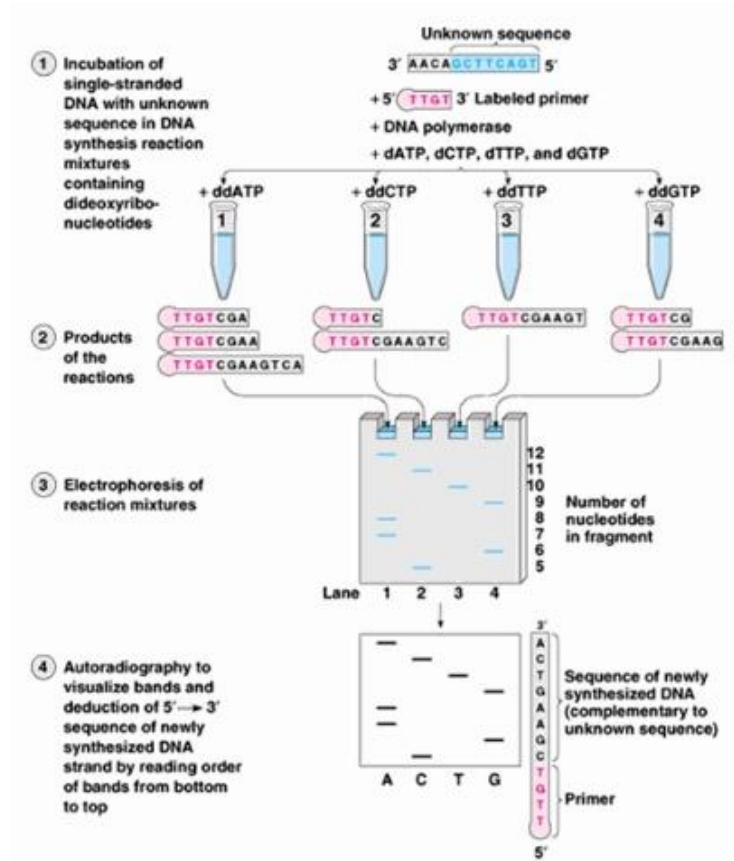


Figure 21 : Principe de la méthode de séquençage de Sanger

Les séquenceurs automatiques modernes utilisent un système de détection in situ pendant l'électrophorèse. Le faisceau d'un laser émettant dans la bande d'absorption du fluorophore traverse le gel (**Figure : 21**).

Pendant la migration, lorsqu'une bande d'ADN passe devant le faisceau, un signal de fluorescence est émis. Celui-ci est capté par une photodiode située en regard du gel. Le signal est amplifié puis transmis à l'ordinateur de contrôle et analysé par un logiciel spécialisé.

Dans des conditions favorables, cette technique permet de lire jusqu'à 1000 nucléotides par fragment séquencé. En routine, la moyenne est de l'ordre 500 à 800 nucléotides par expérience.

Deux méthodologies cohabitent actuellement, reposant sur l'utilisation d'un fluorophore unique ou bien sur celle de quatre traceurs fluorescents possédant des spectres d'émission distincts. Dans le premier cas, les quatre mélanges correspondant à chacun des quatre ddNTP sont déposés sur des puits distincts du gel. L'analyse se fait sur la migration comparée des fragments dans les quatre pistes résultantes. Dans l'autre système, on utilise un fluorophore différent dans chacune des quatre réactions de séquençage. Une solution consiste à utiliser des ddNTP modifiés chacun par un traceur spécifique. Après avoir effectué les quatre réactions de polymérisation, on les mélange et on dépose dans le même puits sur le gel. La reconnaissance des nucléotides se fait alors sur la base des propriétés d'émission du traceur qui passe devant le faisceau laser, au moyen de filtres colorés sélectifs. L'analyse est alors effectuée sur une seule piste du gel.

La technique à quatre fluorophores est un peu plus onéreuse, car elle nécessite une chimie un peu plus diversifiée. En revanche, elle présente l'avantage d'être bien adaptée aux plus hauts débits, car plus d'échantillons peuvent être analysés sur le même gel. Dans les séquenceurs de dernière génération, le gel de polyacrylamide rectangulaire classique est remplacé par un capillaire réutilisable (le principe de la séparation et de la détection reste le même).

Cette technique permet de réduire la durée des expériences de quelques heures à quelques dizaines de minutes et de minimiser le temps passé par l'opérateur pour sa préparation. Les modèles multi-capillaires les plus performants peuvent, en principe, traiter jusqu'à 1000 échantillons par jour, soit un débit théorique de 0,5 Mbases de séquence brute par jour et par machine.

Les centres de séquençage massif possèdent aujourd'hui plusieurs dizaines de ces machines.

Les réactions de séquençage peuvent également être réalisées par des robots qui réalisent automatiquement pipetages, mélanges et incubations et minimisent les risques d'erreur humaine. La préparation des matrices d'ADN reste l'étape la plus lourde à être automatisée, même si de nombreux progrès ont été accomplis.

2.8. 4.3.2. Séquençage nouvelle génération (Next Generation Sequencing, NGS)

Le séquençage nouvelle génération (NGS), également connu sous le nom de séquençage à haut débit, est un terme commun utilisé pour décrire différentes technologies de séquençage moderne comme :

- ✓ Illumina® (Solexa)
- ✓ Roche 454
- ✓ Ion torrent: Proton / PGM
- ✓ SOLiD

Ces technologies récentes permettent de séquencer l'ADN et l'ARN beaucoup plus rapidement que les méthodes précédentes comme le séquençage de Sanger, et comme tels ont révolutionné l'étude de la génomique et de la biologie moléculaire.

Les technologies NGS présentent 3 étapes communes :

La préparation de banques : les banques sont créées en utilisant une fragmentation aléatoire de l'ADN suivie de la liaison avec des petites séquences spécifiques

L'amplification : la banque est amplifiée grâce à des méthodes d'amplification clonale et de PCR

Le séquençage : l'ADN est séquencé en utilisant différentes approches en fonction de la technologie utilisée.

La technologie NGS la plus utilisée est la technologie Illumina®. Cette technologie utilise l'amplification clonale et le séquençage par synthèse (SBS). Le processus permet d'identifier simultanément les bases d'ADN lorsqu'elles sont incorporées dans la chaîne d'acide nucléique. Chaque base émet un signal de fluorescence unique lorsqu'elle est ajoutée au brin en cours de synthèse, ceci est utilisé pour déterminer la séquence d'ADN.

La technologie NGS peut être utilisée pour séquencer l'ADN de n'importe quel organisme, fournissant des informations précieuses en réponse à presque n'importe quelle question biologique. En tant que technologie hautement évolutive, le séquençage de l'ADN peut être appliqué à de petites régions ciblées ou à l'ensemble du génome grâce à une variété de méthodes.

2.8.4.3.3. Southern blot et Northern blot

Les techniques de Southern blot et de Northern blot sont des techniques d'hybridation des acides nucléiques. Elles sont réalisées après séparation des acides nucléiques par électrophorèse et transfert sur membrane de nitrocellulose ou de nylon. Dans ces deux types d'expériences, on cherche à repérer soit dans le génome soit dans les ARNm d'une cellule un fragment particulier, par exemple un gène donné. Pour cela, on utilise une sonde marquée d'ADN dont la séquence est complémentaire du fragment recherché. Le « repérage » se fait par hybridation entre la sonde marquée et le fragment d'ADN ou d'ARNm correspondant. Le marquage de la sonde avec un radioélément ou un fluorochrome permet de visualiser et de quantifier l'hybridation.

3. METHODOLOGIE

3. 1. Lieu d'étude

L'étude s'est déroulée sur 21 sites répartis entre 9 zones sur le territoire du Tchad.

Tableau I : zones d'étude

Différents Zones	Sites d'étude
Zone1	N'Djaména
Zone2	Kanem, Lac Tchad et Barh El Gazal
Zone3	Ennedi Est, Ennedi Ouest, Wadi Fira et Ouaddaï
Zone4	Hadjer Lamis, Batha et Guéra
Zone5	Salamat et Sila
Zone6	Mandoul et Moyen Chari
Zone7	Logone Oriental, Logone Occidental et Tandjilé
Zone8	Mayo-Kebbi Est et Mayo-Kebbi Ouest
Zone9	Chari Baguirmi

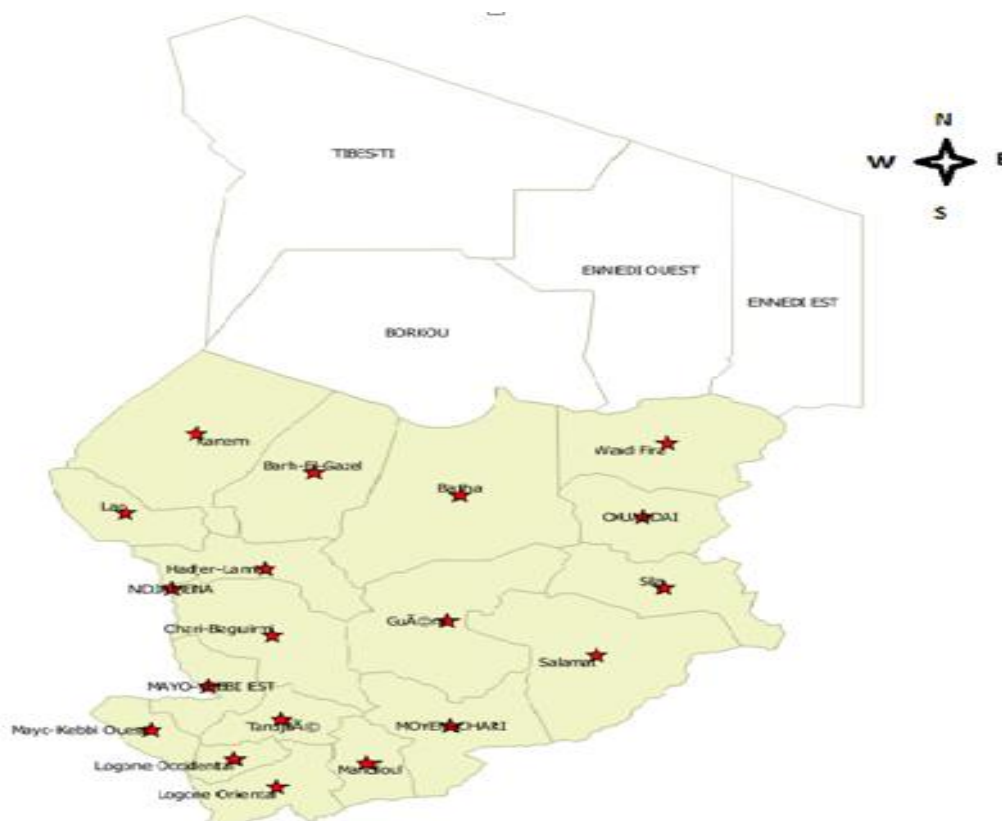


Figure 22 : carte du Tchad représentant les sites d'étude [122]

Le Tchad présente trois zones bio-climatiques qui déterminent trois profils ou faciès épidémiologiques du paludisme [122] :

- ❖ nord désertique, où vit 2,6% de la population totale du pays, est constitué d'oasis et concentre la majorité des cas de paludisme semble importée ;
- ❖ centre, dont le climat est de type sahélien correspond à un paludisme instable, en raison d'une transmission saisonnière courte. La prémunition est longue à apparaître, ce qui explique l'existence de cas de paludisme grave dans toutes les tranches d'âges, y compris les sujets adultes. Aussi, on observe des flambées de paludisme à caractère cyclique et à tendance épidémique. Cette zone représente 18,7% de la population totale.
- ❖ sud, qui représente 78,7% de la population du pays, à climat soudanien, est caractérisé par un paludisme stable. La transmission, quoique

saisonnaire, est longue (plus de 6 mois). En raison des fréquentes piqûres de moustiques infectés, les sujets adultes développent une prémunition. Les cas de paludisme grave s'observent surtout chez les jeunes enfants et les femmes enceintes.

3. 2. Choix de sites d'étude

Les sites ont été choisis sur la base de la prévalence du paludisme dans les différentes zones. En effet, ont été choisis les sites pour lesquels le paludisme est prévalent mais à des degrés différents.

3. 3. Type d'étude

C'était une enquête nationale sur les indicateurs du paludisme au Tchad de 2017 (ENIPT-2017) au cours de laquelle une étude transversale a été menée auprès des ménages représentatifs de la population nationale.

3. 4. Période d'étude

La collecte des échantillons a été faite en 2017 par l'équipe du PNLN de Tchad et l'analyse moléculaire a été faite à Bamako/Mali au laboratoire de biologie moléculaire de l'unité d'épidémiologie moléculaire et de la chimiorésistance en 2018.

3. 5. Population d'étude

Des volontaires appartenant à différentes catégories démographiques (femmes âgées de 15 à 49 ans et des enfants âgés de 6 à 59 mois et de 6 à 14 ans) ont été inclus dans cette étude.

3. 6. Echantillonnage

En fonction des objectifs de l'étude tels que décrits par le PNLP-Tchad, nous avons convenu du choix des confettis à analyser. L'analyse de ces confettis permettra d'avoir des données couvrant les différentes régions du Tchad ainsi que les principales populations cibles. Un tri aléatoire du nombre de confettis par région, groupe d'âge et population cible a été effectué à l'aide de SPSS 16.0. Au total 2208 confettis ont été sélectionnés pour les analyses moléculaires des marqueurs de résistance à la SP, à l'AQ et au diagnostic des espèces plasmodiales. Un autre tri aléatoire a permis de choisir 201 confettis pour l'analyse des marqueurs de résistance aux dérivés de l'Artémisinine PF3D7_1343700 kelch protein K13.

3. 7. Analyse moléculaire :

L'étude de biologie moléculaire a été effectuée dans le laboratoire de l'Unité d'Épidémiologie Moléculaire et de Chimiorésistance (abrévée MEDRU en anglais) du Département d'Épidémiologie des Affections Parasitaires (DEAP) de la Faculté de Pharmacie (FAPH) de l'Université des Sciences des Techniques et de Technologies de Bamako (USTTB).

Nous avons procédé à l'extraction, à l'amplification, à la migration, à la révélation par photographie aux rayons UV de l'ADN plasmodial et à l'interprétation des résultats obtenus. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est la technique qui a été utilisée pour la recherche de mutation et l'identification des espèces plasmodiales.

Les types de PCR que nous avons utilisé pour l'analyse moléculaire des échantillons étaient la méthode RFLP [123].

Il s'agissait d'identifier des mutations sur les gènes de résistance à la sulfadoxine pyriméthamine (*Pfdhfr* : codons 51, 59 et 108 et *Pfdhps* : codon 437

et 540), à l'amodiaquine et la chloroquine (*Pfcr1* : codon 76 et *Pfmdr1* : codon 86) et à l'artémisinine (gène K13).

3. 7. 1. Extraction de l'ADN plasmodial

3. 7. 1. 1. Matériel et réactifs

Blouse, paire de gants, paire de ciseaux, papier hygiénique, confettis, marqueur indélébile, racks, tubes eppendorf, Becher, poubelle, micropipette (100, 200, 1000 µl), embouts (100, 200, 1000 µl), QIAamp DNA Mini Kit, hotte, plaque chauffante, thermomètre à mercure, Bain-marie, vortex, Eau pour nettoyage des ciseaux, congélateur.

3. 7. 1. 2. Mode opératoire

L'extraction de l'ADN plasmodial a été faite à l'aide du Kit QIAGEN.

La procédure d'utilisation du Kit QIAGEN est décrite comme suite :

- nous avons découpé approximativement 3 mm² du papier buvard imprégnés de sang, le transférer dans un microtube de 1,5ml, puis ajouter 180 µl de tampon ATL et incubé à 85°C pendant 10 minutes. Puis centrifuger brièvement.
- la seconde a été précédé par l'ajout de 20 µl de Protéinase K, homogénéisé, et incubé à 56°C sur une plaque chauffante pendant une heure. Puis centrifuger brièvement.
- après nous avons ajouté 200 µl de tampon AL puis homogénéiser, et incubé à 70°C pendant 10 minutes. Centrifuger brièvement pour enlever les gouttes qui se trouvent à l'intérieur du couvercle du tube.
- Ensuite 200 µl d'éthanol (96-100%) a été ajouté à la solution précédant puis homogénéisé. Centrifuger brièvement pour enlever les gouttes qui se trouvent à l'intérieur du couvercle du tube.
- la solution a été Transférer dans des colonnes QIAamp, fermer la colonne puis centrifuger à 8 000 rotations par minute (rpm) pendant 1 minute.

- ensuite les colonnes ont été placées dans des nouveaux tubes de collection, suivi de l'ajout de 500 µl de tampon AW1, puis centrifuger à 8 000 rpm pendant 1 minute.
- les colonnes ont été placées dans des nouveaux tubes de collection, précédé par l'ajout de 500 µl de tampon AW2, puis centrifuger à 14 000 rpm pendant 3 minutes.
- cette dernière a été répétée pendant 1 minute.
- ensuite nous avons placé les colonnes dans des tubes pré labellisés de 1,5 ml suivi de l'ajouter de 150 µl de tampon AE, ces tubes ont été incubés à la température ambiante du labo pendant 1 minute puis centrifuger à 8 000 rpm pendant 1 minute.
- enfin les échantillons étaient prêts pour l'amplification ou garder à la température selon laquelle l'ADN ne perdra pas propriétés.

3. 8. Diagnostic moléculaire des espèces de Plasmodium au Tchad

a) Matériels :

Les matériels et équipement suivants ont été utilisés pour l'identification moléculaire des espèces du Plasmodium infectant l'Homme. Nous avons utilisé la PCR en Temps réel (RT-PCR) pour la détection simultanée des espèces deux à deux comme suit : (*Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax* dans une réaction ; *Plasmodium malariae* et *Plasmodium ovale*) [124][125].

Quantitect Multiplex RT- PCR kit (200)

Les amorces et sondes (probes)

▪ 18S Pf

- ✓ Fluorophore : Cy5
- ✓ Amorces sens : CCGACTAGGTGTTGGATGAAAGTGTTAA
- ✓ Amorces anti- sens : AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA

✓ Séquence de la sonde :

AGCAATCTAAAAGTCACCTCGAAAGATGAC

▪ **18S Pv**

✓ Fluorophore : FAM

✓ Amorce sens : CCGACTAGGCTTTGGATGAAAGATTTT

✓ Amorce anti- sens : AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA

✓ Séquence de la sonde :

AGCAATCTAAGAATAAACTCCGAAGAGAAA

▪ **18S Pm**

✓ Fluorophore : FAM

✓ Amorce sens : CCGACTAGGTGTTGGATGATAGAGTAAA

✓ Amorce anti- sens : AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA

✓ Séquence de la sonde : CTATCTAAAAGAAACACTCAT

▪ **18S Po**

✓ Fluorophore : Cy5

✓ Amorce sens : CCGACTAGGTTTTGGATGAAAGATTTTT

✓ Amorce anti- sens : AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA

✓ Séquence de la sonde : CGAAAGGAATTTTCTTATT

▪ **Actin**

✓ Fluorophore : HEX

✓ Amorce sens : ACCGAGCGCGCTACAG

✓ Amorce anti- sens : CTTAATGTCACGCACGATTTCC

✓ Séquence de la sonde : TTCACCACCACGGCCGAGC

ADN – Uracil Glycosylase, labile à la chaleur

Les plaques de 96 puits (BioRad: HSP9601)

Embouts à filtres stériles

Eau ultra pure pour la biologie moléculaire

Sceller adhésive de plaque, 100/PK (BioRad : MSB1001)

Micropipettes calibrées (10µl, 20µl, 200µl, 1000µl)

Centrifugeuse (Eppendorf ; cat#5804R)

Pipettes multicanaux calibrées (2-20 µl et 20-200 µl)

Thermocycler BioRad C1000 Touch™ équipé du système en temps réel CFX96
BioRad et d'un ordinateur portable HP

Tableau II : Programme d'amplification de la RT-PCR

Programme PCR	Temps	vitesse de la rampe
1. 50oC	20 Minutes (RT-step)	1.7°C/s
2. 95oC	15 Minutes	1.7°C/s
3. 94oC	45 seconds	1.7°C/s
4. 60oC	75 seconds	1.7°C/s
5. Repeat to step 3,	35 times	

3. 9. Amplification de l'ADN plasmodial :

✓ Principe

Le principe est basé sur l'amplification exponentielle in vitro de l'ADN en présence d'amorces spécifiques, de nucléotides, de Taq polymérase et d'un milieu tampon. Les mutations ponctuelles des gènes *Pfdhfr*, *Pfdhps*, *Pfcrt* et *Pfmdr1* sont ensuite déterminées par digestion avec des enzymes de restriction

au niveau des codons 51, 59 et 108 pour *Pfdhfr*, 437 et 540 pour *Pfdhps*, 76 pour *Pfcrt* et 86 pour *Pfmdr1*.

✓ **Echantillon**

Les échantillons sont constitués de l'ADN extrait des confettis au Qiagen.

3. 9. 1. Matériels

Blouse, gants, marqueur indélébile, tubes de 200 μ l ou 500 μ l et 1500 μ l, pipettes (2 ; 10 ; 20 ; 100 ; 200 et 1000 μ l) embout (2 ; 10 ; 20 ; 100 ; 200 et 1000 μ l), racks, portoirs pour pipettes, Thermocycleur, poubelle.

3. 9. 2. Préparation des réactifs de PCR

❖ **dNTPs :**

Une solution de travail équimolaire des quatre dNTPs (désoxy Nucléotide Triphosphate) de 2 mM était préparée à partir d'un stock de 100mM (Cat # INV-10297018).

❖ **Solution tampon (PCR Buffer) :**

Nous avons préparé des milieux réactionnels de PCR :

Pour le stock de travail, on préparait des aliquotes concentrés à 7,5 mM de $MgCl_2$, 12,5mM $MgCl_2$ et 17,5mM $MgCl_2$.

Préparation de Buffer 5X, 7,5mM de $MgCl_2$

La concentration de Buffer dans un volume réactionnel de PCR :

Le stock initial de $MgCl_2$ était de 7,5 mM : C1

Le stock final de $MgCl_2$ était de 1,5 mM : C2

Le volume final d'une réaction de PCR est 25 μ l : V2

Le volume initial de Mgcl2 ?

$$C1V1=C2V2$$

$$V1=C2V2/C1=25 \mu\text{l} *1,5 \text{ mM}/7,5 \text{ mM}= 5 \mu\text{l}$$

Ainsi le volume initial de Mgcl2 est 5 μ l

Pour un volume de 5 μ l de Mgcl2

$$C2=1X, C1= ?, V1=5 \mu\text{l}, V2=25 \mu\text{l}$$

$$C1=25 \mu\text{l}*1X/5 \mu\text{l} =5X$$

Donc la concentration de notre tampon était de 5X

Pour et 5X Buffer 12,5mM de MgCl₂ et 5X Buffer 17,5 mM de MgCl₂, nous avons utilisé le même procédé que le calcul précédant.

La solution était composée d'un mélange d'acide faible et de sa base conjuguée.

❖ Amorces

Les amorces étaient commandées sous forme de poudre (lyophilisée), à partir de laquelle, le stock de travail de 100 μ M était préparé; la concentration finale dans le tube réactionnel était de 1 μ M.

❖ Taq polymérase

La Taq polymérase est une enzyme isolée d'une bactérie thermophile. Cette bactérie est adaptée à la vie dans des sources d'eau chaude.

Il est maintenant possible d'automatiser ces réactions grâce à des appareils programmables en température et en temps (Thermocycleur)

3. 9. 3. Réactifs pour la révélation

❖ Solution de migration, TBE (Tris Borate EDTA):

C'était une solution de pH=8, 54g de Tris base (89mM) (RAD-1610719) ; 27,5g d'acide borique (89mM) (SIG-B6768-1KG) ; et 0,37g d'EDTA (Ethyl-diamine trichloro-acétate) Na (2mM) (SIG-E6758-100G).

Le stock initial avait une concentration de 5 fois ou 5X.

Pour notre solution de migration nous avons besoin d'une solution concentrée à 0,5 fois ou 0,5X.

Nous avons dissout la solution de concentration du TBE 5X dans de l'eau de-ionisée afin d'utiliser la solution de TBE 0,5X pour la migration.

❖ Colorant de migration:

Il s'agit du bleu de bromophénol (BB). Ce colorant était préparé en mesurant 35ml de glycérol, 15ml d'eau de-ionisée et 0,125g de bleu de bromophénol.

❖ Gel de migration:

Il était préparé à partir de 2 g de poudre d'agarose dissout dans du TBE à 0,5X pour avoir un volume de 100ml. La solution est ensuite chauffée dans un four à micro-onde pendant 3 min, permettant ainsi la dissolution complète de l'agarose. Après le chauffage, on y ajoutait un colorant fluorescent, le Red Gel (3ul), puis le gel est coulé dans un moule de migration contenant les peignes. Au bout de quelques minutes ou quelques heures, le gel est prêt à être utilisé pour la migration.

❖ Le Red Gel:

C'est un produit qui va s'intercaler entre les brins d'ADN et les rend fluorescent à la lumière ultra violette.

❖ **Marqueur de poids moléculaire:**

Ce marqueur de poids moléculaires (NEB-N3231S) constituait la solution de référence. Pour la remise en solution des lyophilisats d'amorces, on diluait 100µl de paires de bases de l'ADN dans 400µl d'eau stérile. Puis, on ajoutait 100µl du colorant bleu six fois concentré, pour former un mélange de 600µl.

3. 9. 4. Technique d'amplification

Nous avons procédé à l'amplification d'un fragment de chaque gène *Pfdhfr*, *Pfdhps*, *Pfcrt* et *Pfmdr1*.

3. 9. 4. 1. Détermination des polymorphismes aux codons 51, 59 & 108 (*Pfdhfr* triple mutant)

✓ **Première amplification**

Durant cette première étape, nous avons effectué la procédure suivante [126][127]. :

- Identification des tubes de 200 µl conformément aux numéros des confettis à traiter;
- Préparation du mélange réactionnel dans un tube de 1,5ml en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction;
- Répartition dans chaque tube identifié un volume de 20 µl de mélange réactionnel;
- Ajout de 5µl d'ADN extrait au Qiagen dans chaque tube correspondant;
- Brève centrifugation des tubes;

- Mise en place des tubes bien fermés dans le Thermocycleur pour l'amplification avec le programme approprié.

✓ **Couples d'amorces de la première amplification des codons 51 et 59 du DHFR :**

FR51-A : GCGCGCTAATAACTACACATTTA

FR51-B : CCCGGGCTCTTATATTTC AATTT

Tableau III : Mélange réactionnel de la première amplification de *Pfdhfr* des codons 51 et 59 pour un volume final de 25 µl:

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume par réaction en µl
H2O	-	-	11,875
Buffer/ Mgcl ₂	5X/ 12,5 mM	1X/ 2,5 mM	5
dNTPs	2 mM	200 µM	2,5
FR51-A	100 µM	1 µM	0,25
FR51-B	100 µM	1 µM	0,25
Taq polymérase	5U / µl	0,025U	0,125
Volume Total	-	-	20 µl

On ajoute dans chaque tube 5 µl de l'ADN extrait au Qiagen.

Tableau IV : Programme de la première amplification de *dhfr*

Etapes	Températures	Temps
1 Dénaturation initiale	95°C	5 min
2 Dénaturation	92°C	30 secs
3 Hybridation	45°C	30 secs
4 Elongation	65°C	45 secs

5 Nombre de cycle, 44 cycles

6 Elongation finale

72°C

15 min

Deuxième amplification des codons 51 et 59 du DHFR :

Durant cette seconde étape, nous avons effectué la procédure suivante :

- ✓ Identification des tubes de 200 µl conformément aux numéros des produits de la première amplification à traiter;
- ✓ Préparation du mélange réactionnel dans un tube de 1,5 ml en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction selon les tableaux ci-dessous;
- ✓ Répartition dans chaque tube identifié un volume de 24 µl de mélange réactionnel;
- ✓ Ajout de 1 µl de l'ADN du produit de la première amplification dans le tube correspondant;
- ✓ Brève centrifugation des tubes;
- ✓ Mise en place des tubes bien fermés dans le Thermocycleur pour l'amplification avec le programme approprié; Faire l'électrophorèse sur gel d'agarose à 2%;
- ✓ Prise de la photo du gel.

Couples d'amorces de la deuxième amplification des codons 51 et 59 du DHFR :

FR51-D : CTAGGAAATAAAGGATATTACCATGG

FR59-D : ATTTTTCATATTTTGATTCATTCACATATGTTGTAAGTGTAC

Tableau V : Mélange réactionnel de la deuxième amplification des codons 51 et 59 de *Pfdhfr* pour un volume final de 25 μ l

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume par réaction en μ l
H2O	-	-	11,875
Buffer/ Mgcl ₂	5X/ 12,5 m	1X/ 2,5 mM	5
dNTPs	2 mM	200 μ M	2,5
FR51-D	100 μ M	1 μ M	0,25
FR59-D	100 μ M	1 μ M	0,25
Taq polymérase	5U / μ l	0,025U	0,125
Volume Total	-	-	20 μ l

On ajoute dans chaque tube 1 μ l du produit de la première amplification

Tableau VI : Programme de la deuxième amplification des codons 51 et 59 de *Pfdhfr*

Étapes	Températures	Temps
1 Dénaturation initiale	95°C	5 min
2 Dénaturation	92°C	30 secs
3 Hybridation	45°C	30 secs
4 Elongation	65°C	30 secs
5 Nombre de cycle, 15 cycles		
6 Elongation finale	72°C	15 min

▪ **Digestion enzymatique du produit de la 2^{ème} amplification :**

Elle a concerné les échantillons positifs de la 2^{ème} amplification et il s'agissait pour moi de :

- Incrire sur les tubes les numéros des différents échantillons;
- Préparer le milieu réactionnel pour la digestion (tableau VII);
- Distribuer dans chacun des tubes correspondants 15 µl de ce mélange réactionnel;
- Ajouter 5 µl du produit de la deuxième amplification dans les tubes correspondant et les fermer;
- Mettre en incubation dans un Thermocycleur ou un incubateur ou un bain-marie les tubes à 37 °C pour l'enzyme BsrGI pendant 30 min au minimum ou toute la nuit;
- Enlever les tubes du Thermocycleur après le temps requis et les placer à + 4°C dans un réfrigérateur;
- Procéder à la migration sur gel d'agarose à 2% dans une cuve à migration branché sur un générateur;
- Faire la photo du gel à travers un appareil à UV et un écran de capture d'image.

Tableau VII : Composition du Mélange réactionnel des codons 51 et 59 de *Pfdhfr* de la digestion

Réactifs	Volume par réaction
H2O	12,6 μ l
NE Buffer 2,1	2 μ l
EcoRI pour le codon 51 et BsrGI pour le codon 59	0,4 μ l
Total	15 μ l

Ajouter dans chaque tube 5 μ l du produit de la deuxième amplification.

▪ **Interprétation et validation des résultats :**

Nous avons tenu compte des conditions suivantes lors de l'interprétation de la photographie du gel :

Critères de validité du résultat de l'électrophorèse :

- 1) Conformité de la taille du produit de la digestion par rapport au contrôle positive;
- 2) L'absence de bandes au niveau des contrôles négatifs
- 3) Présence des bandes au niveau des contrôles positifs

Critères de jugement pour la classification d'un échantillon en sauvage ou mutant :

- 1) L'enzyme de restriction utilisée EcoRI coupe les souches de génotypes sauvages entre deux morceaux de 35 et 78 pb.
- 2) Les échantillons avec des bandes de même taille que le témoin sauvage correspondent aux souches sauvages.
- 3) Les échantillons avec des bandes de même taille que le témoin résistant correspondent aux souches mutées.
- 4) Un échantillon est considéré comme mixte quand il présente à la fois une bande correspondant au sauvage et une bande correspondant au mutant.

Couples d'amorces de la première et la deuxième amplification du codon 108 de *Pfdhfr* :

La méthode de préparation du mélange réactionnel pour cette première étape est la même que celle utilisée pour la première PCR et la deuxième PCR des codons 51 et 59 de *Pfdhfr*, les éléments qui changent sont les amorces qui sont représentées ci-dessous et le cycle d'amplification de la deuxième amplification qui se fait de 15-25.

Couples d'amorces de la première PCR

FR100-A : GGGGGGCAGTTACAACATATGTGA

FR100-B : GGGGGCACATTCATATGTACTATTT

Couples d'amorces de la deuxième PCR

FR108-D : CTAATTCTAAAAATTACAAAATGT

FR108-D3 : TTTCTTTTCTAAAAATTCTTGATAAACAAGGGAACCTCTTA

Digestion enzymatique du produit de la 2ème amplification :

La procédure utilisée pour cette digestion est la même que celle utilisée pour la digestion des codons 51 et 59 de *Pfdhfr*

L'élément qui varie est l'enzyme : AluI

Interprétation et validation des résultats :

Les critères de validité et de jugement pour la classification en génotype sauvage ou génotype mutée sont les mêmes que précédemment, l'élément qui change est le suivant :

L'enzyme de restriction utilisée AluI coupe les souches de génotypes résistantes en 40 et 210 p

3. 9. 4. 2. Détermination des mutations ponctuelles aux codons 437 et 540 au niveau de dihydroptéroate synthétase.

▪ Première amplification :

La méthode de préparation du mélange réactionnel pour cette première étape est la même que celle utilisée pour la première PCR des *Pfdhfr* triples mutants, les éléments qui changent sont les amorces qui sont représentées ci-dessous et l'élongation qui se fait à 65°C pendant 45 sec [127][126].

Couples d'amorces de la première amplification :

Amorces spécifiques au codon 437 :

Amorce sens PS400-A : GGGGTATTAAATGTTAATTATGATTCT

Amorce anti-sens PS400-B : GGGGTCACATTTAACAATTTTATT

Amorces spécifiques au codon 540 :

Amorce sens PS500-A : GGGCCCAAACAAATTCTATAGTG

Amorce anti-sens PS500-B : GGCCGGTGGATACTCATCATATA

▪ **Deuxième amplification :**

La méthode de préparation du mélange réactionnel pour cette deuxième étape est la même que celle utilisée pour la deuxième PCR des *Pfdhfr* triples mutants, les éléments qui changent sont les amorces qui sont représentées ci-dessous et l'élongation qui se fait à 65°C pendant 45 sec.

Couple d'amorces de la deuxième amplification:

Amorces spécifiques au codon 437 :

Amorce sens : PS400-D1 : TGTTCAAAGAATGTTTGAAATGA
Amorce anti-sens : PS400-D2 : CCATTCTTTTTGAAATAATTGTAAT

La taille attendue pour les produits de PCR est de 150 pb.

Amorces spécifiques au codon 540 :

Amorce sens : PS500-D1 : GCGCGCGTTCTAATGCATAAAAGAGG

Amorce anti-sens : PS500-D2

CGGGTAAGAGTTTAATAGATTGATCAGCTTTCTTC

La taille attendue pour les produits de PCR est de 210 pb.

Digestion enzymatique du produit de la 2ème amplification :

La procédure utilisée pour cette digestion est la même que celle utilisée pour la digestion des *Pfdhfr* triples. Les éléments qui varient sont les enzymes qui sont représentées par AVAII pour le *Pfdhps* 437 et FOK I pour le *Pfdhps* 540.

▪ Interprétation et validation des résultats

Les critères de validité et de jugement pour la classification en génotype sauvage ou mutant sont les mêmes que précédemment, les éléments qui changent sont les suivants :

- ✓ L'enzyme de restriction utilisée AVA II coupe les souches de génotypes résistantes en 75 et 75 pb.
- ✓ L'enzyme de restriction utilisée FOK I coupe les souches de génotypes résistantes en 145 et 56 pb.

3. 9. 4. 3. Détermination du génotype des codons 86 et 76 au niveau de *Pfmdr1* et *Pfcr1* respectivement [99][128].

▪ Première amplification

La méthode de préparation du mélange réactionnel pour cette première étape est la même que celle utilisée pour la première PCR des *Pfdhfr* triples mutants, les éléments qui changent sont les amorces qui sont représentées ci-dessous et l'élongation qui se fait à 60°C pendant 45 sec.

Couples d'amorces de la première amplification :

Amorces spécifiques au codon 86 de *Pfmdr1* :

Amorce sens MDR-1 : ATGGGGTAAAGAGAGAAAGA

Amorce anti-sens MDR-2 : AACGCAAGTAATACATAAAGTCA

Amorces spécifiques au codon 76 de *Pfcr1* :

Amorce sens P1 : CCGTTAATAATAAATACACGCAG

Amorce anti-sens P2 : CGGATGTTACAAAACACTATAGTTACC

▪ Deuxième amplification

La méthode de préparation du mélange réactionnel pour cette deuxième étape est la même que celle utilisée pour la deuxième PCR des *Pfdhfr* triples mutants, les éléments qui changent sont les amorces qui sont représentées ci-dessous et l'élongation qui se fait à 65°C pendant 45 sec.

Couple d'amorces de la deuxième amplification:

Amorces spécifiques au codon 86 de *Pfmdr1* :

Amorce sens : MDR-3 : TGGTAACCTCAGTATCAAAGAA

Amorce anti-sens : MDR-4 : ATAAACCTAAAAAGGAACTGG

La taille attendue pour les produits de PCR est de 521 pb.

Amorces spécifiques au codon 76 de *Pfcrt* :

Amorce sens : D1: TGTGCTCATGTGTTTAAACTT

Amorce anti-sens : D2: CAAAACCTATAGTTACCAATTTTG

La taille attendue pour les produits de PCR est de 134 pb.

Digestion enzymatique du produit de la 2ème amplification

La procédure utilisée pour cette digestion est la même que celle utilisée pour la digestion des *Pfdhfr* triples. Les éléments qui varient sont les enzymes qui sont représentées et la température de digestion qui est à 50°C pour l'enzyme APO I pour le *Pfcrt* et l'enzyme AFL III pour le *Pfmdr1*.

▪ Interprétation et validation des résultats :

Les critères de validité et de jugement pour la classification en génotype sauvage ou mutant sont les mêmes que précédemment, les éléments qui changent sont les suivants :

- ✓ L'enzyme de restriction utilisée AFL III coupe les souches de génotypes résistantes en 295 et 226 pb.
- ✓ L'enzyme de restriction utilisée APO I coupe les souches de génotypes sensibles en 100 et 34 pb.

3. 9. 4. 4. Analyse des marqueurs de résistance aux dérivés de l'artémisinine PF3D7_1343700 kelch protein K13

Le gène PF3D7_1343700 kelch codant pour la protéine K13 a été amplifié par Nested PCR puis séquencé par la technique de Sanger [108][129][110].

a) Matériels

Les matériels suivants ont été utilisés pour la PCR afin d'amplifier 1309 paires de base pour la première réaction et 1062 pour la deuxième réaction :

BioTaq DNA Polymérase,

MgCl₂ 50mM

10x PCR Buffer

DNTPs

Eau distillée

Amorces pour la première PCR: Kelch 1st R FWD et Kelch 1st R REV

Amorces pour la deuxième PCR : Kelch Nested FWD et Kelch Nested
REV

ADN plasmodial

b) Analyse Bio-informatique.

Les données du séquençage ont été analysées par EMBOSS-6.6.0 et mafft-7.407-gcc sous Bio-Linux et visualisées avec BioEdit sous windows 2010

- i. Les fichiers binaires du séquençage à extension ab1 ont été transformés en fichier fasta par EMBOSS.
- ii. Les séquences forward et reverse ont été concaténés puis alignés par mafft.
- iii. Un consensus est fait entre les deux séquences en utilisant EMBOSS.

- iv. Les mauvaises lectures de nucléotides se trouvant aux extrémités des séquences dans les fichiers de consensus ont été supprimées en utilisant un script en perl.
- v. Les séquences qui n'ont pas une bonne couverture (inférieur à 200 nucléotides) ont été enlevées de l'analyse en utilisant un autre script en perl.
- vi. Toutes les séquences ont été alignées avec la séquence référence (3D7 2181 paires de base) en utilisant mafft.
- vii. Nous avons ensuite visualisé le fichier avec BioEdit pour voir les points et positions de mutation.

3. 10. Gestion et analyse des données

Les données ont été saisies sur Access et analysées sur STATA 13.0.

L'analyse consistait à calculer les fréquences absolues et les pourcentages sur les marqueurs de résistance.

Le numérateur étant le nombre d'échantillons (personnes) portant des parasites mutants ou mixtes (porteur de marqueurs de résistance).

Le dénominateur est le nombre total des échantillons analysés avec des résultats disponibles (mutants, mixtes ou sauvages) pour tous les 5 marqueurs de résistance pour la sulfadoxine-pyriméthamine (*Pfdhfr* N51I, C 59R et S108N et *Pfdhps*-A437G -K 540E) et les 2 marqueurs pour l'Amodiaquine (*Pfcrt*-K76T et *Pfmdr1*-N86Y).

Nous avons calculé les fréquences absolues et les pourcentages des mutations ponctuelles individuelles : *Pfdhfr* 51, 59, 108, et *Pfdhps* 437 et 540, *Pfcrt*76 et *Pfmdr1*. Dans un second temps, nous avons calculé les fréquences absolues et les pourcentages des mutations groupées :

- triple mutation à la dihydrofolate réductase (*Pfdhfr* 51, 59 & 108) ;
- quadruple mutation à la dihydrofolate réductase (*Pfdhfr* 51, 59 & 108) et à la dihydroptéroate synthase (*Pfdhps* 437) ;
- quintuple mutation à la dihydrofolate réductase (*Pfdhfr* 51, 59 & 108) et à la dihydroptéroate synthase (*Pfdhps* 437 & 540) ;
- mutations ponctuelles aux codons 76 et 86 du gène *Pfcrt* et *Pfmdr1* ;
- mutations croisées *Pfcrt Pfmdr1*.

3. 11. Considérations éthiques et déontologiques

Le protocole de l'ENIPT-2017 a été soumis et approuvé par le comité National de Bioéthique du Tchad

4. RESULTATS

4. 1. Diagnostic moléculaire des espèces de plasmodies

Prévalence de l'infection à *Plasmodium* au Tchad étaient de (76,96%), (17,56%), (4,28%) et (1,18%) respectivement pour *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale curtisi* et *Plasmodium ovale wallikeri*

Tableau VIII : Prévalence moléculaire des espèces plasmodiales

Espèces plasmodiales	n/N	%
<i>P. falciparum</i>	1687/2192	76,96
<i>P. malariae</i>	385/2192	17,56
<i>P. ovale curtisi</i>	94/2192	4,28
<i>P. ovale wallikeri</i>	26/2192	1,18

Prévalence des infections mixtes étaient de 68,62% pour *P. falciparum* + *P. malariae*, 16,75% pour *P. falciparum* + *P. ovale curtisi*, 4,63% pour *P. falciparum* + *P. ovale wallikeri*, *P. malariae* + *P. ovale curtisi* 5,70%, *P. malariae* + *P. ovale wallikeri* 2,31% et *P. ovale curtisi* + *P. ovale wallikeri* 1,96%

Tableau IX : Prevalence moléculaire des espèces plasmodiales en associations

Espèces plasmodiales	n/N	%
<i>P. falciparum</i> + <i>P. malariae</i>	770/1122	68,62
<i>P. falciparum</i> + <i>P. ovale curtisi</i>	188/1122	16,75
<i>P. falciparum</i> + <i>P. ovale wallikeri</i>	52/1122	4,63
<i>P. malariae</i> + <i>P. ovale curtisi</i>	64/1122	5,70
<i>P. malariae</i> + <i>P. ovale wallikeri</i>	26/1122	2,31
<i>P. ovale curtisi</i> + <i>P. ovale wallikeri</i>	22/1122	1,96

4. 2.Prévalence des marqueurs moléculaires de la résistance de *P. falciparum* à la SP au Tchad.

Pour la détermination de la fréquence de mutation triple aux codons 51, 59, et 108, nous avons procédé à une première amplification suivie de la deuxième amplification ensuite nous avons sélectionné les échantillons qui ont donné des bandes pour la digestion enzymatique.

Prévalence de mutations triple du gène *dhfr* aux codons 51, 59 et 108 représentait 97,1% dans la population générale, 97% chez les femmes en âge de procréer et 97,5% chez les enfants de 6-59 mois (**Tableau X**).

Tableau X : Prévalence de mutations triple (I₅₁R₅₉N₁₀₈) sur le gène *dhfr* (codons 51, 59 & 108) en fonction des groupes cibles.

Groupes cibles	n/N	%
Population générale 6 mois-49 ans	1968/2026	97,1
Femmes : (15-49) ans	386/398	97
Enfants (6-59) mois	1061/1088	97,5

n= nombre d'échantillons (personnes) portant des parasites mutants ou mixtes

N= nombre total des échantillons analysés avec des résultats disponibles

Prévalence de mutation de la dihydroptéroate synthétase au codon 437 au Tchad était de 36,6%, 35,2% et 42,6% respectivement dans la population générale, chez les femmes âgées de 15-49 ans et les enfants de 6-59 mois (**Tableau XI**)

Tableau XI : Prévalence de mutation de la dihydroptéroate synthétase du codon 437 au Tchad en fonction des groupes cibles.

Groupes cibles	n/N	%
Population générale 6 mois-49 ans	751/2053	36,6
Femmes : (15-49) ans	137/389	35,2
Enfants (6-59) mois	513/1205	42,6

n= nombre d'échantillons (personnes) portant des parasites mutants ou mixtes

N= nombre total des échantillons analysés avec des résultats disponibles

Prévalence de mutation de la dihydroptéroate synthétase au codon 540 dans la population générale était de 10,3%, de 9,7% chez les femmes âgées de (15-49) ans et de 15,4% chez les enfants de (6-59) mois (**Tableau XII**).

Tableau XII : Prévalence de mutation de la dihydroptéroate synthétase du codon 540 au Tchad en fonction des groupes cibles.

Groupes cibles	n/N	%
Population générale 6 mois-49 ans	208/2014	10,3
Femmes : (15-49) ans	36/372	9,7
Enfants (6-59) mois	183/1185	15,4

n= nombre d'échantillons (personnes) portant des parasites mutants ou mixtes

N= nombre total des échantillons analysés avec des résultats disponibles

Prévalence de mutations quadruple (*dhfr* triple mutant + *dhps437* mutant) représentait 35,3% dans la population générale, 33,7% chez les femmes âgées de (15-49) ans et 41,7% chez les enfants (6-59) mois (**Tableau XIII**)

Tableau XIII : Prévalence de quadruple mutation (I₅₁R₅₉N₁₀₈/G₄₃₇) (*dhfr* triple mutant + *dhps437* mutant) en fonction des groupes cibles.

Groupes cibles	n/N	%
Population générale 6 mois-49 ans	699/1978	35,3
Femmes : (15-49) ans	131/389	33,7
(6-59) mois	442/1059	41,7

n= nombre d'échantillons (personnes) portant des parasites mutants ou mixtes

N= nombre total des échantillons analysés avec des résultats disponibles

Prévalence de quintuple mutation (quadruple mutant + *dhps* 540 mutant) est de 3,9% dans la population générale, 3,6% chez les femmes âgées de (15-49) ans et 6,0% chez les enfants (6-59) mois (**Tableau XIV**)

Tableau XIV : Prévalence de mutation quintuple (I₅₁R₅₉N₁₀₈G₄₃₇E₅₄₀) (quadruple mutant + *dhps* 540 mutant) en fonction des groupes cibles.

Groupes cibles	n/N	%
Population générale 6 mois-49 ans	74/1898	3,9
Femmes : (15-49) ans	13/365	3,6
Enfants (6-59) mois	62/1018	6,0

n= nombre d'échantillons (personnes) portant des parasites mutants ou mixtes

N= nombre total des échantillons analysés avec des résultats disponibles

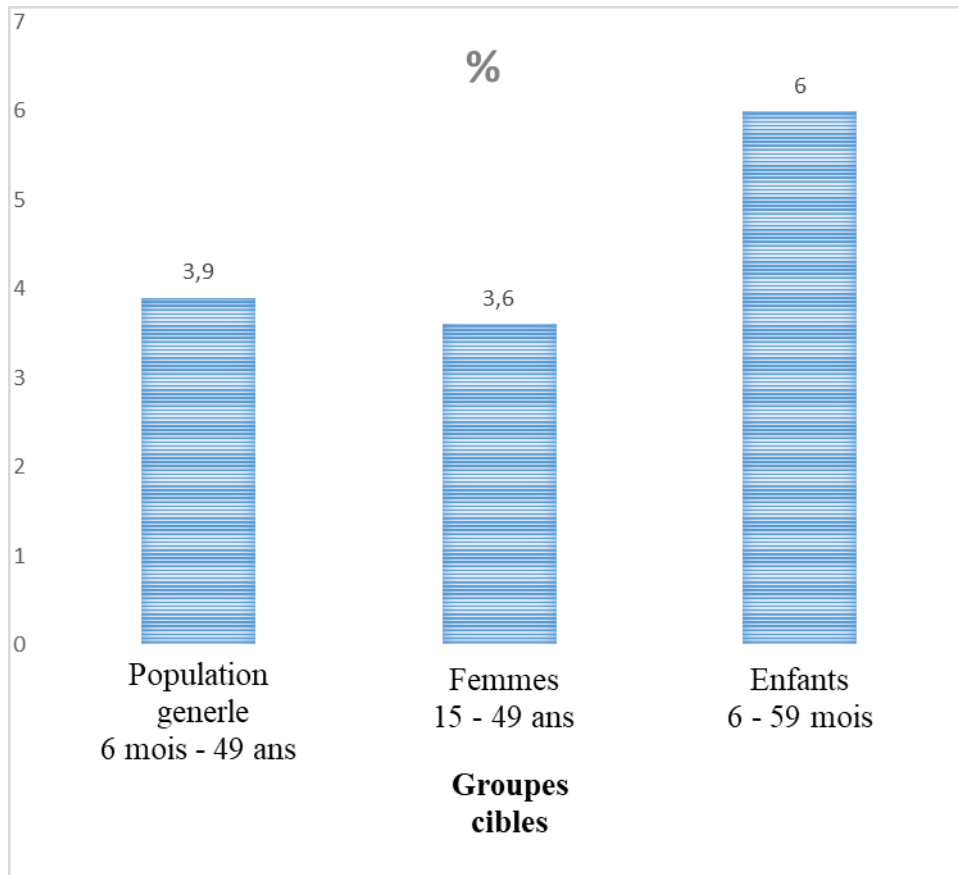


Figure 23 : Prévalence des mutations quintuples en fonction des groupes cibles

La prévalence des mutations quintuples est plus élevée chez les enfants de 6-59 mois que chez les autres groupes cibles.

4. 3. Prévalence des marqueurs moléculaires de la résistance de *P. falciparum* à l'AQ

Nous avons le même procédé d'amplification pour la détermination des mutations sur des gènes *Pfcr* et *Pmdr1*

Prévalence de l'allèle 76T du gène de la chloroquino-résistance transporteur représentait 37,9% dans la population générale, 32,7% chez les femmes âgées de 15 à 49 ans et 38% chez les enfants de 6-59 mois (**Tableau XV**)

Tableau XV : Prévalence de l'allèle 76T du gène *Pfcr* dans la population au Tchad en fonction des groupes cibles.

Groupes cibles	n/N	%
Population générale 6 mois-49 ans	744/1961	37,9
Femmes : (15-49) ans	119/364	32,7
Enfants (6-59) mois	437/1149	38,0

n= nombre d'échantillons (personnes) portant des parasites mutants ou mixtes

N= nombre total des échantillons analysés avec des résultats disponibles

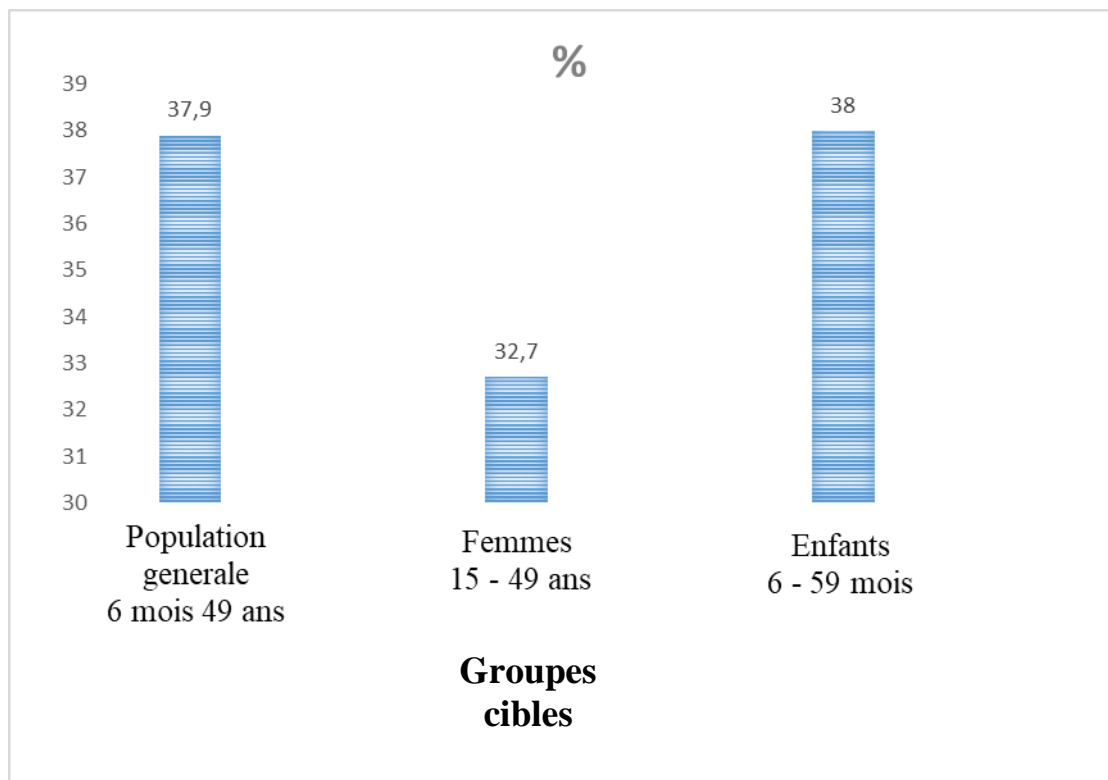


Figure 24 : Prévalence de l'allèle 76T du gène *Pfcrt* en fonction des groupes cibles

La prévalence de l'allèle 76T du gène *Pfcrt* est beaucoup importante chez les enfants âgés de 6-59 mois que chez les autres groupes cibles.

Prévalence de l'allèle 86Y du gène *Pfmdr1* était de 20,6% dans la population générale de Tchad, 15,1% chez les femmes âgées de 15-49 ans et 28,1% chez les enfants de 6-59 mois (**Tableau XVI**)

Tableau XVI : Prévalence de l'allèle 86Y de *Pfmdr1* dans la population au Tchad en fonction des groupes cibles.

Groupes cibles	n/N	%
Population générale 6 mois-49 ans	120/1819	20,6
Femmes : (15-49) ans	56/371	15,1
Enfants (6-59) mois	290/1031	28,1

n= nombre d'échantillons (personnes) portant des parasites mutants ou mixtes

N= nombre total des échantillons analysés avec des résultats disponibles

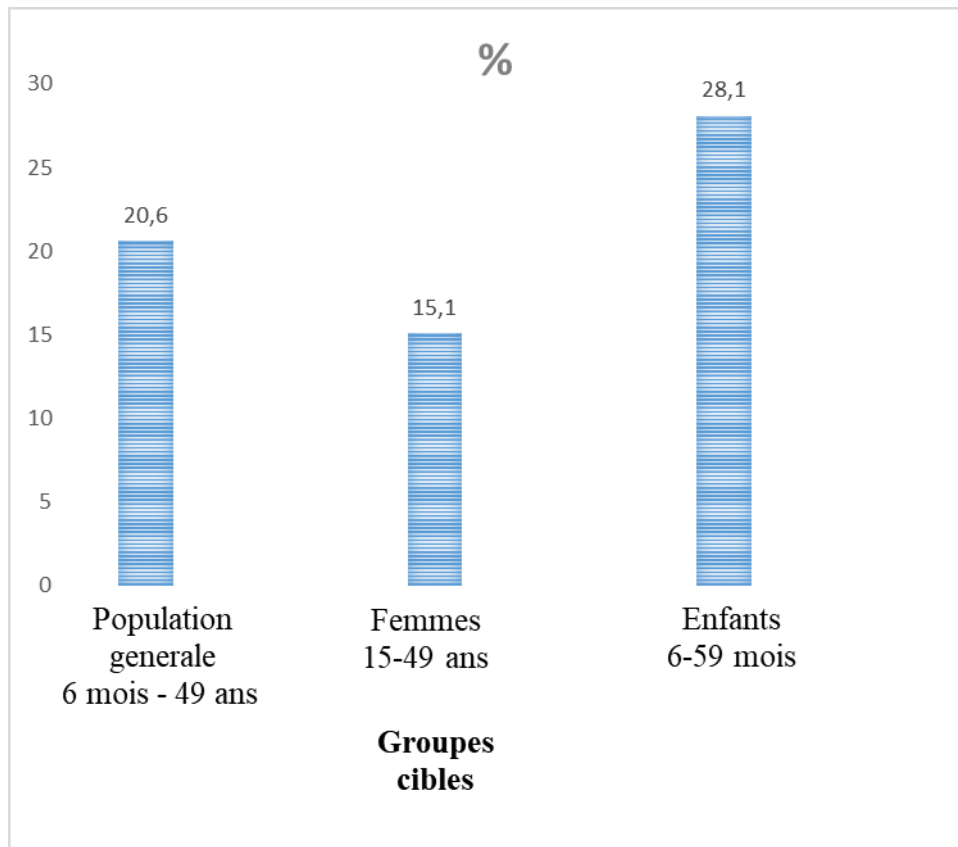


Figure 25 : Prévalence de l'allèle 86Y de *Pfmdr1* en fonction des groupes cibles

Nous constatons une présence élevée de la prévalence de mutation l'allèle 86Y de *Pfmdr1* chez enfants de 6-59 mois que chez les autres groupes cibles.

Prévalence des mutations croisées *Pfcrt* et *Pfmdr1* respectivement aux codons 76 et 86 s'élevait à 6,6% dans la population générale de Tchad, 4,1% chez les femmes âgées de 15-49 ans et 9,3% chez les enfants de 6-59 mois (**Tableau XVII**)

Tableau XVII : Prévalence des mutations croisées du gène *Pfcrt* & *Pfmdr1* dans la population au Tchad en fonction des groupes cibles

Groupes cibles	n/N	%
Population générale 6 mois-49 ans	120/1819	6,6
Femmes : (15-49) ans	14/341	4,1
(6-59) mois	90/341	9,3

4. 4. Marqueurs moléculaires de la résistance aux dérivés de l'artémisinine

Deux cent un (201/201) échantillons étaient positifs à la nested PCR. 100% des échantillons ont pu être séquencés

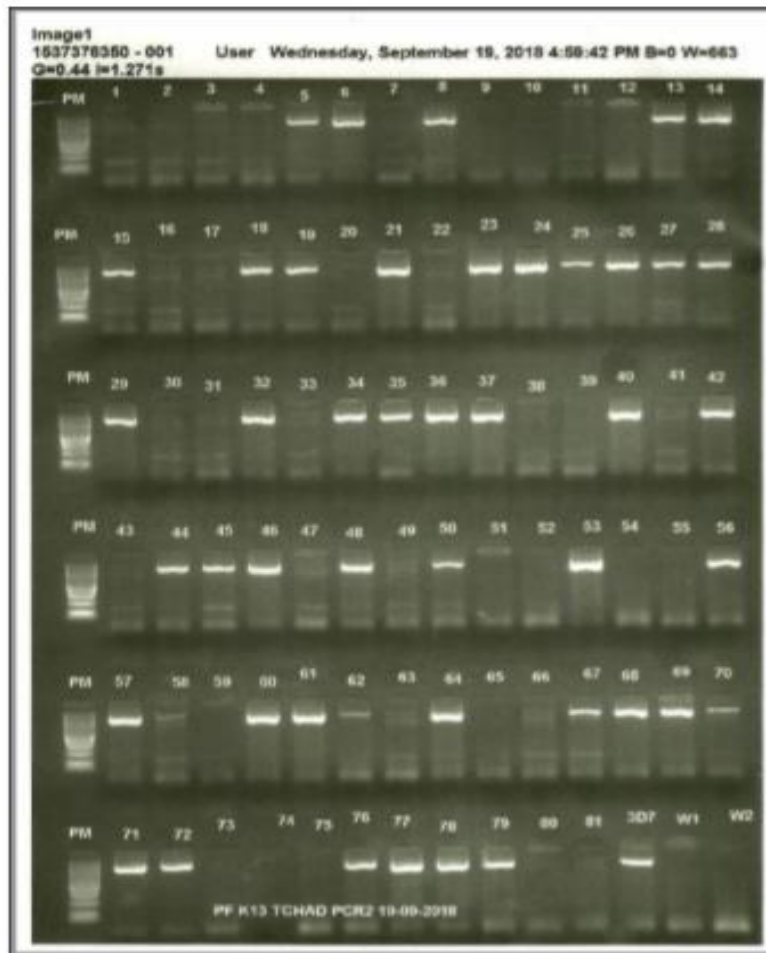


Figure 26 : Photo du gel d'électrophorèse du produit de la deuxième PCR du gène K13 propeller

- La prévalence de mutation synonyme de *Pfk13* représentait **2,5%** et celle de mutation non synonyme *Pfk13* était de **0,5%** au Tchad

(**Tableau XVIII**)

Tableau XVIII : Distribution du polymorphisme du gène K13 propeller

Position des codons	Référence des nucléotides	Référence des mutations	Référence des acides aminés	Mutation des acides aminés	Nombre des échantillons
567	gaG	gaA	E(Glu)	E(Glu)	2
589	gtC	gtG	V(Val)	V(Val)	2
605	gaA	gaC	E(Glu)	D(Asp)	1
616	gcC	gcG	A(Ala)	A(Ala)	1

Fréquence de Mutation synonyme : 0.025

Fréquence de mutation non synonyme : 0.005

5. DISCUSSION

✓ Prévalence moléculaire des espèces Plasmodiales

Prévalence des infections à *Plasmodium* au Tchad étaient de **65,4%**, **25,2%**, **7%** et **2,4%** respectivement pour *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri*. Nos résultats sont similaires aux ceux observés au Burkina Fasso en 2013 par Awa Gnémé et collaborateurs qui ont trouvé **68,19%**, **6,51%** et **1,08%** respectivement pour *P. falciparum*, *P. malariae* et *P. ovale* [130].

Nous n'avons pas trouvé d'infection à *Plasmodium vivax* dans cette population d'étude.

✓ Prévalence de triple mutation du gène *Pfdhfr* au Tchad

Prévalence de mutations triple du gène *dhfr* aux codons 51, 59 et 108 représentait **97,1%** dans la population générale, **97%** chez les femmes âgées de (15-49) ans et **97,5%** chez les enfants de 6-59 mois. Cette proportion élevée de mutation montre qu'il serait important de mettre l'accent sur la surveillance régulière de l'efficacité de sulfadoxine-pyriméthamine au Tchad.

Nos résultats de mutations triple (**97%**) chez les enfants de 6-59 mois étaient similaires à ceux observés au Bénin (**97%**) en 2006 par R. Tahar et collaborateurs [131], au Cameroun (99%) en 2017 par Tobias O. Apinjoh et collaborateurs [132].

Mais par contre nos résultats de mutations triple chez les enfants de 6-59 mois (**97%**) étaient largement supérieurs à ceux signalés au Tchad (3,33%) en 2018 par ISSA Mahamat Souleymane et collaborateurs [16]. Les deux résultats sont très contradictoires et cette observation nécessite un éclaircissement. Cette différence s'expliquerait probablement par la différence des tailles des échantillons des deux études d'une part. En effet, ces auteurs ont travaillé sur seulement 30 échantillons à l'échelle du Pays, tandis que notre étude a porté sur

2208 échantillons. D'autre part nous avons adopté la méthode PCR RFLP par contre ces auteurs ont utilisé la PCR RFLP et le séquençage pour l'analyse moléculaire.

✓ **Prévalence de mutations quadruple au Tchad**

Prévalence de mutations quadruple (*dhfr* triple mutant + *dhps*437 mutant) représentait **35,3%** dans la population générale, **33,7%** chez les femmes âgées de (15-49) ans et **41,7%** chez les enfants (6-59) mois.

Nos résultats de mutations quadruple **33,7%** chez les femmes âgées de (15-49) ans étaient inférieurs à ceux obtenue chez les femmes enceintes en 2018 par Emrah RUH et collaborateurs **47,9%** en République Démocratique du Congo [133] mais supérieurs à ceux obtenue en 2016 chez les femmes enceintes en Angola **24%** par Kaingona Daniel et collaborateurs [134].

Cette augmentation de la prévalence en RDC et la diminution en Angola pourrait s'expliquer soit la pression médicamenteuse dans ces pays, soit le faciès épidémiologique de ces deux pays comparés au Tchad.

Prévalence de quadruple mutation **41,7%** chez les enfants (6-59) mois dans notre étude était inférieur à ceux observé en 2012 au Mali (57,6%) par Hamma et al [135]. Cette différence pourrait s'expliquée soit la pression médicamenteuse, soit les années de collecte des données.

✓ **Prévalence de mutations quintuple au Tchad**

Prévalence de mutations quintuples (quadruple mutant + *dhps* 540 mutant) représentait **3,9%** dans la population générale, **3,6%** chez les femmes âgées de (15-49) ans et **6,0%** chez les enfants (6-59) mois.

Nos résultats de prévalence de mutations quintuples **3,6%** chez les femmes âgées de (15-49) ans était similaire à celui de **2,1%** observé en 2018 par Emrah RUH et collaborateurs en République Démocratique du Congo [133].

n'était pas similaire à celle obtenue en Tanzanie par Sungwa I Matondo et collaborateurs en 2014 [136] ; qui ont signalé que le quintuple mutant était le plus répandu dans toutes les régions et variait significativement de **(37,5 à 90,2%)**.

Nos résultats de mutations quintuples **6,0%** chez les enfants (6-59) mois évoluaient dans le même sens que ceux rapportés au Mali 11,6% en 2007 par Dicko et collaborateurs [137] et en Guinée **9,6% en 2007** par Maryline Bonnet et collaborateurs [138].

✓ **Prévalence de la mutation du gène de la chloroquino-résistance transporter (*Pfcr*) au Tchad**

Prévalence de l'allèle mutant du gène de la chloroquino-résistance transporteur représentait **37,9%** dans la population générale, **32,7%** chez les femmes âgées de (15-49) ans et **38,0%** chez les enfants de (6-59) mois au Tchad. Nos résultats vont dans le même sens que celui **41%** trouvé au Mali en 2001 par Abdoulaye Djimde et collaborateurs [139] et celui de **47,3%** obtenu au Cameroun en 2017 par Tobias Apinjoh et collaborateurs [132]. Cette légère baisse pourrait s'expliquer par l'arrêt de l'usage de la chloroquine partout en Afrique qui sélectionnait l'allèle mutant.

✓ **Prévalence de l'allèle mutant du gène multi-drug résistance 1 (*Pfmdr1*)**

Prévalence de l'allèle mutant du gène de la multi-drug résistance était de **20,6%** dans la population générale au Tchad, **15,1%** chez les femmes âgées (15-49) ans et **28,1%** chez les enfants (6-59) mois. Nos résultats n'étaient pas similaires à celui de **50%** observé au Mali par Abdoulaye Djimde et collaborateurs en 2001 [140]. Cette différence pourrait s'expliquer par la pression due à la luméfantine qui est un médicament partenaire de la combinaison artéméter-luméfantine qui sélectionne l'allèle sauvage et diminue la fréquence des mutants [141].

Par contre la prévalence de mutation du gène *Plasmodium falciparum* multi-drug résistance chez les femmes âgées (15-49) ans était de **28,1%**, cette valeur était similaire à celle de **28,6%** observée en Angola par Paula Figueiredo et collaborateurs en 2008 [142].

✓ **Prévalence de mutations croisées (*Pfcr1* et *Pfmdr1*) au Tchad.**

Prévalence de mutation croisée (*Pfcr1* et *Pfmdr1*) s'élevait à **6,6%** dans l'ensemble du territoire au Tchad, **4,1%** chez les femmes âgées de (15-49) ans et **9,3%** chez les enfants de (6-59) mois.

Nos résultats de mutations croisées **4,1%** chez les femmes âgées de (15-49) ans étaient similaires à ceux observés en 2017 par Pedro Berzosa et al 2,1% , en Guinée équatoriale [143] mais inférieurs à ceux observé au centre de l'Inde **82%** en 2017 par Priyanka Patel et collaborateurs [144]. Cette observation pourrait s'expliquer par la différence des faciès épidémiologiques d'une part et d'autre part par la grande pression médicamenteuse qui existe en Inde, qui est un pays connu pour son usage élevé des médicaments en général et en particulier des antipaludiques.

Nos résultats double mutation **9,3%** chez les enfants de (6-59) mois étaient inférieurs à ceux rapportés en 2012 au Mali 18,8% par Hama et collaborateurs chez les enfants de moins de 5 ans [135]. Cette différence pourrait s'expliquée soit la pression médicamenteuse, soit les années de collecte des données.

Ce taux faible de la prévalence de la double mutation *Pfcr1* 76T+*Pfmdr1* 86Y suggère une bonne efficacité de l'amodiaquine au Tchad.

✓ **Marqueurs moléculaires de la résistance de *P. falciparum* aux dérivés de l'artémisinine**

Deux cent un (201/201) échantillons étaient positifs à la nested PCR. 100% des échantillons ont pu être séquencés

Prévalence de mutation synonyme de *PfK13* représentait **2,5%** et celle de mutation non synonyme *PfK13* était de **0,5%** au Tchad. Nos résultats de mutation synonyme de *PfK13* étaient similaires aux taux de **2,26%** trouvé au Burkina Faso en 2016 par Anyirekun Fabrice et collaborateurs [145] ; mais aussi au taux de 3% trouvé au Cameroun en 2017 par Tobias Apinjoh et collaborateurs [132].

6. CONCLUSION

Les résultats de cette étude ont montré des fréquences élevées de mutant triple *Pfdhfr* mais des fréquences basses de mutant quadruple, quintuple (*Pfdhfr* + *Pfdhps*). Les fréquences des mutations dans les gènes *Pfcrt* et *Pfmdr1* étaient faibles et celles de K13 étaient très faibles au Tchad. La formule parasitaire classique avec une prédominance de *P. falciparum* et une absence de *P. vivax*. Nous décrivons pour la première fois la présence de deux nouvelles espèces *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* au Tchad

7. RECOMMANDATIONS

Au PNLP :

- ✓ Effectuer des collectes des confettis avant, pendant et après les campagnes de la chimio-prévention du paludisme saisonnier (CPS).

Aux Autorités :

- ✓ Mise en place d'un laboratoire de biologie moléculaire afin de mettre l'accent sur la surveillance de l'efficacité de molécules antipaludiques.

8. REFERENCE:

- [1] V. Rajaonarivelo et al, Les anophèles et la transmission du paludisme à Ambohimena, village de la marge occidentale des Hautes-Terres Malgaches, *Parasite*, vol. 11, no. 1, pp. 75–82, 2004.
- [2] T. Schindler et al, Molecular monitoring of the diversity of human pathogenic malaria species in blood donations on Bioko Island, Equatorial Guinea, *Malar. J.*, vol. 18, no. 1, pp. 1–11, 2019.
- [3] J. G. Dombrowski et al, Malaria during pregnancy and newborn outcome in an unstable transmission area in Brazil: A population-based record linkage study, *PLoS One*, vol. 13, no. 6, pp. 1–16, 2018.
- [4] E. M. Matubi et al, Détermination des paramètres bioécologiques et entomologiques d’anopheles gambiae sl dans la transmission du paludisme à Bandundu-ville, république démocratique de Congo, *Pan Afr. Med. J.*, vol. 22, pp. 283–290, 2015.
- [5] A. Bachmann et al, Controlled human malaria infection with *Plasmodium falciparum* demonstrates impact of naturally acquired immunity on virulence gene expression, *PLoS Pathog.*, vol. 15, no. 7, pp. 1–24, 2019.
- [6] N. Saralamba et al, Genetic polymorphisms in the circumsporozoite protein of *Plasmodium malariae* show a geographical bias, *Malar. J.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–9, 2018.
- [7] C. López et al, What is known about the immune response induced by *Plasmodium vivax* malaria vaccine candidates?, *Front. Immunol.*, vol. 8, no. FEB, 2017.
- [8] M. C. Oguike et al, Dimorphism in genes encoding sexual-stage proteins of *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri*, *Int. J. Parasitol.*, 2015.

- [9] J. M. Chavatte et al, Molecular characterization of misidentified *Plasmodium ovale* imported cases in Singapore, *Malar. J.*, vol. 14, no. 1, pp. 1–15, 2015.
- [10] “V. Joste et al, Distinction of *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi* using quantitative Polymerase Chain Reaction with High Resolution Melting revelation, *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, .”
- [11] B. Singh et al, Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*, *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 26, no. 2, pp. 165–184, 2013.
- [12] Rapport de l’Organisation Mondiale de la Santé sur le Paludisme, Web: www.who.int/malaria no. 266 000, pp. 1–30, 2018.”
- [13] Migliani R. et al, Histoire de la lutte contre le paludisme dans l’armée française : de l’Algérie à l’Armée d’Orient pendant la Première Guerre mondiale, *Medecine et Santé Tropicales* 2014 ; 24 : 349-361.
- [14] Enquête Nationale sur les Indicateurs du Paludisme au Tchad de 2017 : ENIPT-2017, Vol : xlv, 2017.
- [15] Ministère de la santé du Tchad (2014). Programme Nationale de Lutte Contre le Paludisme (PNLP). Plan Stratégique National de lutte contre le paludisme 2014-2018. Document, N’Djaména, 148 p.
- [16] I. M. Souleymane et al, Prevalence of Sulfadoxine – pyrimethamine resistance- associated mutations in *dhfr* and *dhps* gene of *Plasmodium falciparum* isolates collected in Pala west region of Chad, vol. 5, no. 1, pp. 271–277, 2018.
- [17] F. E. Cox et al, History of the discovery of the malaria parasites and their vectors, *Parasites and Vectors*, vol. 3, no. 1, p. 5, 2010.
- [18] P. Alano et al, *Plasmodium falciparum* gametocytes: Still many secrets of

- a hidden life, *Mol. Microbiol.*, vol. 66, no. 2, pp. 291–302, 2007.
- [19] M. C. Oguike et al Dimorphism in genes encoding sexual-stage proteins of *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri*,” *Int. J. Parasitol.*, vol. 45, no. 7, pp. 449–454, 2015.
- [20] A. Djimdé et al, Application of a molecular marker for surveillance of chloroquine-resistant *falciparum* malaria, *Lancet*, vol. 358, no. 9285, pp. 890–891, 2001.
- [21] UNIVERSITE PARIS XII DJAMAN : Allico Joseph : Évaluation de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* à différents antipaludiques (chloroquine , sulfadoxine-pyriméthamine , quinine) et profil génétique des isolats correspondants,” pp. 1–175, 2003.
- [22] M. Imwong et al, The spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in the Greater Mekong subregion: a molecular epidemiology observational study, *Lancet Infect. Dis.*, vol. 17, no. 5, pp. 491–497, 2017.
- [23] Mota M. Met al, Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science*, 291, 141-144, 2001.
- [24] A. Siau et al, Temperature shift and host cell contact up-regulate sporozoite expression of *Plasmodium falciparum* genes involved in hepatocyte infection, *PLoS Pathog.*, vol. 4, no. 8, 2008.
- [25] Frevort U et al, *Plasmodium* sporozoite passage across the sinusoidal cell layer. (D. S.-F. Barbara A Burleigh, Éd.) Molecular mechanism of parasite invasion, pp. 183-197, 2008
- [26] Robert V et al, Biologie de la transmission homme - moustique du *Plasmodium*. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 96, 6-20, 2003.

- [27] Sturn A et al, Manipulation of host hepatocytes by malaria parasites for delivery into sinusoids. *Science*, 313, 1287-1290, 2006
- [28] J. R. Murphy et al, Continuation of chloroquine-susceptible *Plasmodium falciparum* parasitemia in volunteers receiving chloroquine therapy, *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 34, no. 4, pp. 676–679, 1990.
- [29] Bannister L.H et al, A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitology Today*, 16, 427- 433, 2000.
- [30] Day K.P et al, The biology of *Plasmodium falciparum* transmission stages. *Parasitology*, 116 Suppl, S95-109, 1998.
- [31] A. M. Talman et al, Gametocytogenesis: The puberty of *Plasmodium falciparum*, *Malar. J.*, vol. 3, pp. 1–14, 2004.
- [32] Matuschewski K et al, Getting infectious: formation and maturation of *Plasmodium* sporozoites in the *Anopheles* vector. *Cellular Microbiology*, 8: 1547-1556, 2006.
- [33] Sinden R.E et al, Sexual development of malarial parasites. *Advances in Parasitology*, 22: 153-216, 1983.
- [34] Janse C.J et al, DNA synthesis in *Plasmodium berghei* during asexual and sexual development. *Molecular and Biochemical Parasitology* , 20: 173-182, 1986.
- [35] Sinden R.E et al, Identification of the meiotic division of malarial parasites. *The Journal of Protozoology*, 32: 742-744, 1985.
- [36] “Sinden R.E et al, The development of *Plasmodium* ookinetes in vitro: an ultrastructural study including a description of meiotic division. *Parasitology*, 91 : 227-244, 1985.

- [37] Siden-kiamos I et al, Interactions between malaria parasite and their mosquito hosts in the midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34 : 679-685, 2004.
- [38] Kaiser K et al, Differential transcriptome profiling identifies Plasmodium genes encoding pre-erythrocytic stage specific proteins. *Molecular Microbiology*, 51: 1221-1232, 2004.
- [39] Golvan J.Y et al, *Eléments de parasitologie médicale : Paris : 4ère Ed*, Flammarion, 571p, 1983.
- [40] G. G. MacPherson et al, Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration., *Am. J. Pathol.*, vol. 119, no. 3, pp. 385–401, 1985.
- [41] F. Legros et al, Paludisme d ' importation en France : modalités de surveillance et principales caractéristiques épidémiologiques, vol. XXIII, pp. 100–108, 2008.
- [42] Djibo A et al, Black water fever in adults with sickle cell anemia. Two fatal cases. *Med Trop* 2000;60:156-68.
- [43] WHO. Severe and complicated malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* ed. 2000.
- [44] WHO 2. Assessment of the safety of artemisinin compounds in pregnancy. Geneva. WHO/CDS/MAL ed. 2003.
- [45] Ambroise Thomas P et al. Le diagnostic du paludisme: actualités et perspectives. *Cahiers santé* ed. 1993.
- [46] Organisation mondiale de la Santé., Stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme 2016-2030, p. 39, 2016.
- [47] P. Delaunay et al, Diagnostic du paludisme : Frottis sanguin, goutte épaisse

- et tests antigéniques, *Med. Mal. Infect.*, vol. 38, no. SUPPL. 2, 2008.
- [48] I. Multiples, Tchad, pp. 2014–2015, 2015.
- [49] Mariam Traore. Synthèses et évaluations de nouveaux composés antipaludiques et antitoxoplasmoses. Microbiologie et Parasitologie. Université de Grenoble, 2012. Français. ffNNT : 2012GRENV041ff. fftel-00858336f.
- [50] P. Winstanley et al, The disposition of amodiaquine in Zambians and Nigerians with malaria., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 29, no. 6, pp. 695–701, 1990.
- [51] K. A. Neftel et al, Amodiaquine induced agranulocytosis and liver damage, *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed).*, vol. 292, no. 6522, pp. 721–723, 1986.
- [52] H. Misbahi et al, Paludisme : Mode d’action de la chloroquine et mécanisme de la chloroquinorresistance, *J. Pharm. Clin.*, vol. 32, no. 3, pp. 143–153, 2013.
- [53] J. Le Bras et al, Mécanismes et dynamique des chimiorésistances de *Plasmodium falciparum*, *Bull. la Soc. Pathol. Exot.*, vol. 92, no. 4, pp. 236–241, 1999.
- [54] J. Achan et al, Artemether-Lumefantrine Pharmacokinetics and Clinical Response Are Uncomplicated Falciparum Malaria, vol. 60, no. 3, pp. 1274–1282, 2016.
- [55] W. Antimalarial et al, Artemether-lumefantrine treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: a systematic review and meta-analysis of day 7 lumefantrine concentrations and therapeutic response using individual patient data, *BMC Med.*, vol. 13, p. 227, 2015.

- [56] M. Van Vugt et al, A case-control auditory evaluation of patients treated with artemisinin derivatives for multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 62, no. 1, pp. 65–69, 2000.
- [57] K. Schulz et al, Degradation products of proguanil - 4-chloroaniline and related components with regard to genotoxicity, *Chem. Pap.*, vol. 67, no. 6, pp. 657–666, 2013.
- [58] S. L. Croft et al, Review of pyronaridine anti-malarial properties and product characteristics, *Malar. J.*, vol. 11, no. 1, p. 1, 2012.
- [59] Methaneethorn J et al, Population pharmacokinetics of pyronaridine following oral pyronaridine/artesunate treatment in healthy and malaria infected subjects. *Am J Trop Med Hyg* 2011, 1):199.
- [60] Guideline on reporting the results of population pharmacokinetic analyses. European Medicines Agency 2008. Accessed Dec, 2009.
- [61] Organisation Mondiale de la Santé, Directives pour le traitement du paludisme – Deuxième édition, pp. 1–201, 2011.
- [62] R. Saiki et al, Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, vol. 230, no. 4732. pp. 1350–1354, 1985.
- [63] P. Byakika-Kibwika et al, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous artesunate during severe malaria treatment in Ugandan adults, *Malar. J.*, vol. 11, pp. 1–6, 2012.
- [64] C. A. Morris et al, Review of the clinical pharmacokinetics of artesunate and its active metabolite dihydroartemisinin following intravenous, intramuscular, oral or rectal administration, *Malar. J.*, vol. 10, pp. 1–17, 2011.

- [65] P. N. Newton et al, Comparison of oral artesunate and dihydroartemisinin antimalarial bioavailabilities in acute falciparum malaria, *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 46, no. 4, pp. 1125–1127, 2002.
- [66] R. Price et al, Adverse effects in patients with acute *Plasmodium falciparum* malaria treated with artemisinin derivatives., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 60, no. 4, pp. 547–555, 1999.
- [67] L. Manning et al, Meningeal inflammation increases artemether concentrations in cerebrospinal fluid in Papua New Guinean children treated with intramuscular artemether, *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 55, no. 11, pp. 5027–5033, 2011.
- [68] A. Assefa et al, Therapeutic efficacy of Artemether/ Lumefantrine (Coartem®) against *Plasmodium falciparum* in Kersa, South West Ethiopia, *Parasit Vectors*, vol. 3, p. 1, 2010.
- [69] M. K. Laufer et al, Monitoring antimalarial drug efficacy: Current challenges, *Curr. Infect. Dis. Rep.*, vol. 11, no. 1, pp. 59–65, 2009.
- [70] J. Hatcher et al, Antibiotic resistance mechanisms in the intensive care unit 1A02 2C03 3A13, *J. Intensive Care Soc.*, vol. 13, no. 4, pp. 297–303, 2012.
- [71] H. Nikaido et al, Prevention of drug access to bacterial target: Permeability barriers and active efflux, *Science*, vol. 264, no. April, pp. 382–388, 1994.
- [72] B. Genton et al, *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: A prospective cohort study from Papua New Guinea, *PLoS Med.*, vol. 5, no. 6, pp. 0881–0889, 2008.
- [73] B. Hanboonkunupakarn et al, The threat of artemisinin resistant malaria in Southeast Asia, *Travel Med. Infect. Dis.*, vol. 14, no. 6, pp. 548–550, 2016.

- [74] K. Na-Bangchang et al, Identification of resistance of *Plasmodium falciparum* to artesunate-mefloquine combination in an area along the Thai-Myanmar border: integration of clinico-parasitological response, systemic drug exposure, and in vitro parasite sensitivity, *Malar. J.*, vol. 12, no. 1, p. 263, 2013.
- [75] W. H. O, World Health Organization: World Malaria Report 2018. www.who.int/malaria (2018). Accessed 18 Jan 2018. 2018.
- [76] D. J. Bzik et al, Molecular cloning and sequence analysis of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 84, no. 23, pp. 8360–4, 1987.
- [77] A. F. Cowman et al, Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 85, no. 23, pp. 9109–9113, 1988.
- [78] P. Wang et al, Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilization, *Mol. Microbiol.*, vol. 23, no. 5, pp. 979–986, 1997.
- [79] W. Sirawaraporn et al, The dihydrofolate reductase domain of plasmodium falciparum thymidylate synthase-dihydrofolate reductase. Gene synthesis, expression, and anti- folate-resistant mutants, *J. Biol. Chem.*, vol. 268, no. 29, pp. 21637–21644, 1993.
- [80] A. Nzila et al, In vitro selection of *Plasmodium falciparum* drug-resistant parasite lines, *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 65, no. 3, pp. 390–398, 2009.
- [81] D. A. Fidock et al, Mutations in the *P. falciparum* Digestive Vacuole

Transmembrane Protein PfCRT and Evidence for Their Role in Chloroquine Resistance, *Mol. Cell*, vol. 6, no. 4, pp. 861–871, 2000.

- [82] A. M. Lehane et al, Chloroquine resistance-conferring mutations in *pfcr*t give rise to a chloroquine-associated H⁺ leak from the malaria parasite's digestive vacuole, *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 52, no. 12, pp. 4374–4380, 2008.
- [83] G. Dorsey et al, Polymorphisms in the *Plasmodium falciparum Pfcr*t and *Pfmdr-1* genes and clinical response to chloroquine in Kampala, Uganda., *J. Infect. Dis.*, vol. 183, no. 9, pp. 1417–20, 2001.
- [84] J. Raman et al, Absence of kelch13 artemisinin resistance markers but strong selection for lumefantrine-tolerance molecular markers following 18 years of artemisinin-based combination therapy use in Mpumalanga Province, South Africa (2001-2018), *Malar. J.*, vol. 18, no. 1, pp. 1–12, 2019.
- [85] S. G. Valderramos et al, Investigations into the role of the *Plasmodium falciparum* SERCA (PfATP6) L263E mutation in artemisinin action and resistance, *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 54, no. 9, pp. 3842–3852, 2010.
- [86] F. Ariey et al, A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*, *Nature*, vol. 505, no. 7481, pp. 50–55, 2016.
- [87] S. Menard et al, Insight into k13-propeller gene polymorphism and ex vivo DHA-response profiles from Cameroonian isolates, *Malar. J.*, vol. 15, no. 1, p. 572, 2016.
- [88] Chulay JD et al, . Synergistic antimalarial activity of pyrimethamine and sulfadoxine against *Plasmodium falciparum* in vitro. *Am J Trop Med Hyg* 1984;33:325–30.

- [89] Christopher V. Plowe et al, Mutations in *Plasmodium falciparum* Dihydrofolate Reductase and Dihydropteroate Synthase and Epidemiologic Patterns of Pyrimethamine- Sulfadoxine Use and Resistance. *The Journal of Infectious Diseases* 1997;176:1590–6.
- [90] Peterson DS et al, . Prevalence of the dihydrofolate reductase Asn-108 mutation as the basis for pyrimethamine-resistant falciparum malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 1991;45:492–7.
- [91] Sherwan Zindroua et al, *Plasmodium falciparum*:Mutation Pattern in the Dihydrofolate Reductase–Thymidylate Synthase Genes of Vietnamese Isolates, a Novel Mutation, and Coexistence of Two Clones in a Thai Patient *Experimental Parasitology* : Volume 84,
- [92] L. K. Basco et al, Molecular basis of in vivo resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in African adult patients infected with *Plasmodium falciparum* malaria parasites, *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 42, no. 7, pp. 1811–1814, 1998.
- [93] Zindrou S et al, Analysis of *Pfcr*, *Pfmdr1*, *dhfr*, and DHPS mutations and drug sensitivities in *Plasmodium falciparum* isolates from patients in Vietnam before and after treatment with artemisinin *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2003
- [94] Omar, S.A. et al. (2001) *Plasmodium falciparum* in Kenya: high prevalence of drug-resistance-associated polymorphisms in hospital admissions with severe malaria in an epidemic area. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 95, 661–669.
- [95] D. R. Brooks et al, Sequence Variation of the Hydroxymethyldihydropterin Pyrophosphokinase: Dihydropteroate Synthase Gene in Lines of the Human Malaria Parasite, *Plasmodium*

- falciparum*, with Differing Resistance to Sulfadoxine, *Eur. J. Biochem.*, vol. 224, no. 2, pp. 397–405, 1994.
- [96] Kublin, J.G. et al. (2002) Molecular markers for failure of sulfadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil-dapsone treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *J. Infect. Dis.* 185, 380–388.
- [97] J. Millet et al, Polymorphism in *Plasmodium falciparum* Drug Transporter Proteins and Reversal of In Vitro Chloroquine Resistance by a 9 , 10-Dihydroethanoanthracene Derivative, vol. 48, no. 12, pp. 4869–4872, 2004.
- [98] Basco LK, Ringwald P: Analysis of the key *Pfcr*t point mutation and in vitro and in vivo response to chloroquine in Yaounde, Cameroon. *J Infect Dis* 2001, 183:1828–1831.
- [99] Djimdé A et al, A Molecular marker for chloroquine- resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 2001, 344:257–263.
- [100] Baraka V et al, In vivo selection of *Plasmodium falciparum Pfcr*t and *Pfmdr*1 variants by artemether-lumefantrine and dihydroartemisinin piperazine in Burkina Faso *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* : 2015, Volume : 59, Pages : 734-737.
- [101] Comparative Efficacies of Artemisinin Combination Therapies in *Plasmodium falciparum* Malaria and Polymorphism of pfATPase6 , pfcr t , pfdhfr , and pfdhps Genes in Tea Gardens of Jalpaiguri District , pp. 2511–2517, 2012.
- [102] Mita T et al, : Role of *Pfmdr*1 mutations on chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates with pfcr t K76T from Papua New Guinea, *acta trop* May, 2006.
- [103] Basco LK et al, Analysis of pfmdr1 and drug susceptibility in fresh

- isolates of *Plasmodium falciparum* from Sub-Saharan Africa. *Mol Biochem Parasitol* 1995, 74:157–166.
- [104] Borowski E et al, Strategies for overcoming ABC-transporters-mediated multidrug resistance (MDR) of tumor cells. In *Acta Biochimica Polonica*. Volume 52; 2005:609–627.
- [105] M. Venkatesan et al, Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter and multidrug resistance 1 genes: Parasite risk factors that affect treatment outcomes for *P. falciparum* malaria after artemether-lumefantrine and artesunate-amodiaquine, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 91, no. 4, pp. 833–843, 2014.
- [106] P. Sondo et al., Artesunate-Amodiaquine and Artemether-Lumefantrine Therapies and Selection of *Pfcr* and *Pfmdr1* Alleles in Nanoro, Burkina Faso, *PLoS One*, vol. 11, no. 3, p. e0151565, 2016.
- [107] Adams J et al, The kelch repeat superfamily of proteins: Propellers of cell function. *Trends in Cell Biology* 2000:17–24.
- [108] Judith Straimer et al, Drug Resistance. K13-propeller Mutations Confer Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Clinical Isolates, *Science* : 2015 Jan 23;347(6220):428-31.
- [109] A. P. Ramadani et al, K13-Propeller Mutations Confer Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Clinical Isolates, *Science (80-.)*, vol. 347, no. 6220, pp. 428–431, 2015.
- [110] Tacoli C et al, Artemisinin Resistance-Associated K13 Polymorphisms of *Plasmodium falciparum* in Southern Rwanda, 2010-2015. *Am J Trop Med Hyg* 2016.
- [111] Bayih AG et al, A unique *Plasmodium falciparum* K13 gene mutation in Northwest Ethiopia. *Am J Trop Med Hyg* 2016, 94:132–135.

- [112] World Health Organization: Methods for Surveillance of Antimalarial Drug Efficac. 2009.
- [113] L. E. D. E. S. Antipaludiques, Evaluation et surveillance de l'efficacité des antipaludiques pour le traitement du paludisme à *Plasmodium falciparum*, p. 87, 2004.
- [114] Le Bras J et *Plasmodium falciparum*: Interprétation du semi-micro-test de chimiosensibilité par incorporation de l'hypoxanthine radioactive. Path Bio 1984:463–466.
- [115] Le Bras J and Deloron P, "In vitro study of drug sensitivity of *P. falciparum*: Evaluation of new semi-microtests," *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 32, no. 3, pp. 447–451, 1983.
- [116] R. E. Desjardins et al, Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique, *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 16, no. 6, pp. 710–718, 1979.
- [117] R. E. Desjardins et al, Quantitative Activity Semiautomated Technique, *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 16, no. 6, pp. 710–718, 1979.
- [118] S. Sharma et al, Comparison of WHO mark III and HRP II ELISA for in vitro sensitivity of *Plasmodium falciparum*, *J. Vector Borne Dis.*, vol. 53, no. 4, pp. 341–347, 2016.
- [119] Mullis K et al, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1986, 51:263–273.
- [120] Air GM HJ et al, DNA-dependent RNA polymerase from the thermophilic bacterium *Thermus aquaticus*. FEBS Lett , 38:277–81.
- [121] Innis MA et al, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MA: DNA sequencing

with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85:9436–9440.

- [122] Ministère de la Santé et de la Protection Sociale and ISF, *Enquête sur les Indicateurs du Paludisme au Togo 2017*, 2017.
- [123] Duraisingh MT et al, *Plasmodium falciparum*: detection of polymorphisms in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes by PCR and restriction digestion. *Exp Parasitol*. 1998; 89:1–8. PMID: 9603482.
- [124] S. E. Shokoples et al, Multiplexed real-time PCR assay for discrimination of *Plasmodium* species with improved sensitivity for mixed infections, *J. Clin. Microbiol.*, vol. 47, no. 4, pp. 975–980, 2009.
- [125] M. Phuong et al, Sequence-based optimization of a quantitative real-time PCR assay for detection of *Plasmodium ovale* and *Plasmodium malariae*, *J. Clin. Microbiol.*, vol. 52, no. 4, pp. 1068–1073, 2014.
- [126] C. V. Plowe et al, Pyrimethamine and Proguanil Resistance-Confering Mutations in *Plasmodium falciparum* Dihydrofolate Reductase: Polymerase Chain Reaction Methods for Surveillance in Africa, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 52, no. 6, pp. 565–568, Jun. 1995.
- [127] C. V. Plowe et al., Mutations in *Plasmodium falciparum* Dihydrofolate Reductase and Dihydropteroate Synthase and Epidemiologic Patterns of Pyrimethamine-Sulfadoxine Use and Resistance, *J. Infect. Dis.*, vol. 176, no. 6, pp. 1590–1596, 1997.
- [128] Basco LK et al Analysis of the key pfcrt point mutation and in vitro and in vivo response to chloroquine in Yaounde, Cameroon. *J Infect Dis* 2001, 183:1828–1831.

- [129] Carter TE et al, Artemisinin resistance-associated polymorphisms at the K13-propeller locus are absent in *Plasmodium falciparum* isolates from Haiti. *Am J Trop Med Hyg* 2015, 92:552–554.
- [130] A. Gnémé et al, Plasmodium species occurrence, temporal distribution and interaction in a child-aged population in rural Burkina Faso, *Malar. J.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–9, 2013.
- [131] R. Tahar et al, Surveillance de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine par le test moléculaire à São Tome et Príncipe, *Bull. la Soc. Pathol. Exot.*, vol. 100, no. 2, pp. 115–118, 2007.
- [132] T. O. Apinjoh et al, Molecular markers for artemisinin and partner drug resistance in natural *Plasmodium falciparum* populations following increased insecticide treated net coverage along the slope of mount Cameroon: Cross-sectional study, *Infect. Dis. Poverty*, vol. 6, no. 1, pp. 1–10, 2017.
- [133] E. Ruh et al, Molecular identification of sulfadoxine - pyrimethamine resistance in malaria infected women who received intermittent preventive treatment in the Democratic Republic of Congo, *Malar. J.*, pp. 1–7, 2018.
- [134] E. P. S. K. Daniel et al, Low - grade sulfadoxine – pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* parasites from Lubango , Angola,” *Malar. J.*, pp. 1–6, 2016.
- [135] H. Maiga et al, Seasonal Malaria Chemoprevention with Sulphadoxine-Pyrimethamine and Amodiaquine Selects *Pfdhfr-dhps* Quintuple Mutant Genotype in Mali, vol. 310, no. 2014, pp. 1–12, 2016.
- [136] S. I. Matondo *et al*, High levels of sulphadoxine-pyrimethamine resistance *Pfdhfr-Pfdhps* quintuple mutations: A cross sectional survey of six regions in Tanzania, *Malar. J.*, vol. 13, no. 1, 2014.

- [137] A. Dicko et al, Molecular markers of resistance to sulphadoxine-pyrimethamine one year after implementation of intermittent preventive treatment of malaria in infants in Mali, pp. 1–7, 2010.
- [138] M. Bonnet et al, Efficacy of antimalarial treatment in Guinea : in vivo study of two artemisinin combination therapies in Dabola and molecular markers of resistance to sulphadoxine-pyrimethamine in, vol. 8, pp. 1–8, 2007.
- [139] ABDOULAYE DJIMDÉ et al, A MOLECULAR MARKER FOR CHLOROQUINE-RESISTANT FALCIPARUM MALARIA, N Engl J Med, Vol. 344, No. 4 , January 25, 2001.
- [140] B. C et al, , a Molecular Marker for Chloroquine-Resistant *Plasmodium falciparum* Malaria , *English J.*, vol. 344, no. 4, pp. 257–263, 2001.
- [141] Christin Sisowath et al., In vivo selection of *Plasmodium falciparum* pfmdr1 86N coding Alleles by artemether-lumefantrine (Coartem). JID, 2005 :191.
- [142] P. Figueiredo et al, Prevalence of *Pfmdr1*, *Pfcr1*, *Pfdhfr* and *Pfdhps* mutations associated with drug resistance, in Luanda, Angola, *Malar. J.*, vol. 7, pp. 1–7, 2008.
- [143] P. Berzosa et al, Profile of molecular mutations in *Pfdhfr*, *Pfdhps*, *Pfmdr1*, and *Pfcr1* genes of *Plasmodium falciparum* related to resistance to different anti-malarial drugs in the Bata District (Equatorial Guinea),” *Malar. J.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–10, 2017.
- [144] P. Patel et al, Prevalence of mutations linked to antimalarial resistance in *Plasmodium falciparum* from Chhattisgarh, Central India: A malaria elimination point of view, *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–8, 2017.
- [145] A. F. Somé et al, Polymorphisms in K13, *Pfcr1*, *Pfmdr1*, *Pfdhfr*, and

Pfdhps in parasites isolated from symptomatic malaria patients in Burkina Faso, *Parasite*, vol. 23, 2016.

FICHE SIGNALITIQUE

Nom: TRAORE

Prénom: Bilaly

Nationalité: Malienne

Année de soutenance:

Ville de soutenance: Bamako

Lieu de dépôt: Bibliothèque de la Faculté de Pharmacie (FAPH)

Secteur d'intérêt: Parasitologie, Biologie moléculaire

Titre:

EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DE LA RESISTANCE DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* AUX MEDICAMENTS ANTIPALUDIQUES EN REPUBLIQUE DU TCHAD

Introduction :

A cause de l'insuffisance de données sur la prévalence des marqueurs moléculaires au Tchad, le PNLP a entrepris une enquête nationale transversale pour évaluer l'efficacité des molécules antipaludiques utilisés lors de la campagne de chimio-prévention du paludisme saisonnier chez les enfants de (6-59) mois et le traitement présomptif intermittente pendant la grossesse

Méthodes :

D'octobre à novembre 2017, des échantillons de sang sur papier buvard séché ont été collectés dans 21 zones de santé à travers le Tchad. Des PCR ont été effectuées sur ces échantillons au laboratoire du Centre de recherche et de formation sur le paludisme à Bamako, au Mali. Sur la base des objectifs de l'étude tels que décrits par le PNLP-Tchad, nous nous sommes mis d'accord sur le choix des confettis à analyser. Ces confettis, une fois entièrement analysés, fourniront des données couvrant les différentes régions du Tchad ainsi que les principales populations cibles. Un tri aléatoire du nombre de confettis par région, groupe d'âge et population cible a été effectué en utilisant le SPSS 16.0 Les mutations ponctuelles actuelles ont été évaluées sur les gènes suivants : *Pf dhfr*, *Pf dhps*, *Pf mdr1* et *Pf k13*

Résultats :

Un total de 2208 échantillons a été analysé sur 8325 échantillons collectés. Les prévalences nationales des parasites mutants étaient respectivement de 97,1%, 10,3% et 3,9% pour le triple mutant *dhfr*, *dhps*-540 et le quintuple mutant. Pour *Pf mdr1* et *Pf crt*, la prévalence des parasites portant l'allèle mutant 86Y pour *Pf mdr1* et l'allèle mutant 76T pour *Pf crt* était respectivement de 20,6% et 37,9%. Un SNP non synonyme (A605C) du gène K13 a été trouvé avec une fréquence d'allèle inférieure à 0,5 %.

Conclusion:

Les résultats de cette étude ont montré des prévalences élevées de triple mutant *Pf dhfr* mais des faibles fréquences de quadruple, de quintuple mutant (*Pf dhfr* + *Pf dhps*). Les fréquences des mutations des gènes *Pf crt* et *Pf mdr* étaient faibles et celles de K13 étaient très faibles.

Mots clés: *Plasmodium falciparum*, marqueurs moléculaires, Tchad

Title:

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF PLASMODIUM FALCIPARUM RESISTANCE TO ANTIMALARIAL DRUGS IN THE REPUBLIC OF CHAD

Background:

Due to the lack of data on the prevalence of molecular markers in Chad, the NMCP has undertaken a national cross-sectional survey to evaluate the efficacy of antimalarial molecules used during the chemo-prevention campaign for seasonal malaria in children aged (6-59) months and intermittent presumptive treatment during pregnancy.

Methods:

From October to November 2017, Dried blotting paper blood samples were collected in 21 health zone across Chad. PCRs were performed on these samples at the Malaria Research and Training Center laboratory in Bamako, Mali. Based on the objectives of the study as described by the NMCP-Chad, we agreed on the choice of confetti to be analyzed. These confetti, once fully analyzed, will provide data covering the different regions of Chad as well as the main target populations. A random sorting of the number of confetti by Region, age group and target population was carried out using SPSS 16.0. Current point mutations were evaluated on the following genes: *Pfdhfr*, *Pfdhps*, *Pfmdr1* and *Pfk13*.

Résultats :

A total of 2208 samples were analyzed out of 8325 samples collected. The national prevalence of the mutant parasites were 97.1%, 10.3% and 3.9% for the triple mutant *dhfr*, *dhps-540* and the quintuple mutant respectively. For *Pfmdr1* and *Pfcrt*, the prevalence of parasites carrying the 86Y mutant allele for *Pfmdr1* and the 76T mutant allele for *Pfcrt* were 20.6% and 37.9% respectively. A non-synonymous SNP (A605C) of the K13 gene was found with an allele frequency of less than 0.5%.

Conclusion:

The results of this study showed high frequencies of triple *Pfdhfr* mutant but low frequencies of quadruple, quintuple mutant (*Pfdhfr* + *Pfdhps*). The frequencies of mutations in the *Pfcrt* and *Pfmdr* genes were low and those of K13 were very low in Chad.

Key words: *Plasmodium falciparum*, molecular markers, Chad.

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples:

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

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

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque. Je le jure!