

Abréviations :

ACT : combinaison thérapeutique d'antipaludiques

ATP : Adénine Tri Phosphate

CRT : Chloroquine Resistance Transporter

CTP : Cytosine Tri Phosphate

DHPS : Dihydroptéorate Synthétase

DHFR : Dihydrofolate Réductase

dNTPs : désoxyNucléotides Tri Phosphate

DP : Densité Parasitaire

GTP : Guanine Tri Phosphate

Kb : kilobase

MDR : Multi Drogue Resistance

MS-PCR : Marqueurs Spécifiques Polymerase Chain Reaction

OMS : Organisation Mondiale de le Santé

PCR : Polymerase Chain Reaction

PEV : Programme Elargi de Vaccination

PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme

QBC : Quantitative Buffy Coat

RFLP : Restriction Fragment Lince Polymorph

SP : sulfadoxine-pyriméthamine

TDO : Traitement Directement Observé

TDR : Test De Diagnostic Rapide

TPI : Traitement Préventif Intermittent

TTP : Thymine Tri Phosphate

USAID : Agence des Etats-Unis pour le Développement International

Liste des figures

Figure 1 : Cycle de développement de Plasmodium falciparum[74].....	10
Figure 2: faciès géographiques du Sénégal [72].....	13
Figure 3 : Schéma du mécanisme d'action des antimétaboliques.....	24
Figure 4 : Carte du district de Kédougou et de Saraya.....	52
Figure 5 : Carte district de Tambacounda.....	53
Figure 6: Dénaturation de l'ADN [73]	60
Figure 7: Hybridation de l'ADN [73].....	61
Figure 8 : Elongation.....	62
Figure 9 : Répartition des patients en fonction du site et du sexe.....	90
Figure 10: Combinaison des mutations au niveau de Kédougou.....	98
Figure 11: Combinaison des mutations au niveau de Saraya.....	99
Figure 12: Combinaison des mutations au niveau de Vélingara.....	100
Figure 13: Combinaison des mutations au niveau de Tambacounda.....	100
Figure 14 : Histogramme de la prévalence des mutations en fonction du site et des codons en pourcentage.....	101
Figure 15 : Histogramme montrant la combinaison des mutations des gènes DHFR et DHPS.....	102

Liste des tableaux

Tableau 1 : Définition du paludisme à <i>Plasmodium falciparum</i> grave ou compliqué d'après l'OMS (2002).....	19
Tableau 2 : Classification des réponses au traitement.....	43
Tableau 3 : Matériel et méthodes.....	55
Tableau 4 : Pourcentage de l'agarose et de l'acrylamide en fonction de la taille des fragments en kb	68
Tableau 5 : Protocole de la PCR.....	77
Tableau 6 : MIX pour la digestion des codons 437 et 540.....	80
Tableau 7 : Poids des primers 108, 59,51.....	81
Tableau 8 : Composition du master mix pour la première amplification.....	83
Tableau 9 : Programme de la première amplification commun aux codons 51, 59 et 108.....	83
Tableau 10 : Composition des taux master mix pour la deuxième amplification.....	85
Tableau 11 : Programme de la deuxième amplification du codon 51.....	85
Tableau 12 : Programme de la deuxième amplification du codon 59.....	86
Tableau 13 : Programme de la deuxième amplification du codon 108.....	86
Tableau 14 : Répartition des échantillons et de la Densité Parasitaire en fonction du site....	89
Tableau 15 : Répartition des échantillons en fonction du site d'étude.....	90
Tableau 16 : Proportion d'échantillons mutés en fonction du site.....	92
Tableau 17 : Distribution des mutations pour le codon 108.....	93
Tableau 18 : Distribution des mutations pour le codon 59.....	93
Tableau 19 : Distribution des mutations pour le codon 51.....	94
Tableau 20 : Distribution des mutations pour le codon 437.....	95
Tableau 21 : Distribution des mutations pour le codon 540.....	96
Tableau 22 : Distribution des mutations en fonction des sites.....	96
Tableau 23 : Combinaison des mutations des gènes DHFR et DHPS.....	97
Tableau 24 : Combinaison des mutations en fonction du site.....	98

Table des matières

<i>Introduction</i>	1
<i>Chapitre I: Rappels sur le paludisme</i>	5
I. Généralités.....	12
II. Définition	12
III. Epidémiologie	12
III.1. Agents pathogènes.....	13
III.1.1. Classification	13
III.1.2. Cycle évolutif [14,45]	14
III.1.3. Mode de contamination.....	18
III.2. Vecteur	18
IV. Facteurs favorisant la transmission.....	19
V. Faciès épidémiologiques	19
VI. Clinique [14,45]	21
VI.1. Accès simples.....	21
VI.2. Accès pernicieux	23
VI.3. Paludisme viscéral évolutif	23
VI.4. Fièvre bilieuse hémoglobinurique.....	24
VII. Diagnostic biologique	27
VII.1. Frottis sanguin	27
VII.2. Goutte épaisse	27
VII.3. Q. B. C. test.....	27
VII.4. Polymerase Chain Reaction (P.C.R.).....	28
VII.5. Tests de Diagnostic Rapide (TDR).....	28
VIII. Traitement du paludisme	28
VIII.1. Traitement curatif	28
VIII.1.1. Schizonticides.....	29
VIII.1.1.1. <i>Schizonticides naturels</i>	29
VIII.1.1.2. <i>Schizonticides de synthèse</i>	30
VIII.1.2. Gamétocytocides	32
VIII.2. Traitement préventif	32
VIII.2.1. Traitement Préventif Intermittent (TPI) avec la sulfadoxine-pyriméthamine (SP).....	32
VIII.2.1.1. <i>Traitement préventif intermittent chez la femme enceinte</i>	32
VIII.2.1.2. <i>Traitement préventif intermittent chez les enfants de moins de cinq ans</i> .	34
<i>Chapitre II : Chimiorésistance</i>	39
I. Définition	39
II. Facteurs favorisant la chimiorésistance	39
II.1. Pression médicamenteuse et la sélection des mutants	40
II.2. Degré d'immunité de la population	40
II.3. Voyages	41

III. Mécanismes de la résistance aux antipaludiques	41
III.1. Mécanismes de la résistance à la Sulfadoxine-pyriméthamine (SP).....	41
III.1.1. Mutations du gène DHFR	43
III.1.2. Mutations du gène DHPS	44
III.2. Mécanismes de résistance de <i>P.falciparum</i> aux autres antipaludiques.....	46
III.2.1. Chloroquine	46
III.2.2. Autres antipaludiques	48
IV. Méthode d'évaluation de la chimiorésistance	49
IV.1. Test de sensibilité in vivo.....	49
IV.2. Tests de sensibilité in vitro (antipaludogramme).....	51
IV.3. Génotypage moléculaire	52
IV.4. Méthodes moléculaires	52
IV.4.1. PCR	52
IV.4.2. Dot blot	52
IV.4.3. Southern blot	53
IV.4.4. Séquençage.....	53
<i>Chapitre I :Matériel et méthodes</i>	49
I. Matériel.....	58
I.1. Zones d'études	58
I.1.1. District de Vélingara	58
I.1.2. District de Kédougou et celui de Saraya.....	58
I.1.3. District de Tambacounda	59
I.2. Population étudiée.....	60
I.3. Prélèvements	61
I.4. Matériel et réactifs de laboratoire (Tableau 4).....	62
II. Méthode d'étude	63
II.1. Extraction d'ADN plasmodial par le méthanol	63
II.2. Préparation des solutions de dNTPs	65
II.3. PCR.....	65
II.3.1. Principe de la PCR.....	65
II.3.2. Etapes de la PCR	66
II.3.3. Composants de la réaction	70
II.3.4. Détection et analyse des produits de PCR.....	75
II.3.5. Contaminations en PCR.....	78
II.3.6. Utilisation des enzymes de restriction	79
II.4. Electrophorèse	79
II.5. La Polymerase Chain Reaction (PCR)-Restriction Fragment Lince Polymorph (RFLP).....	81
II.5.1. La « Nested PCR » pour le gène DHPS	81
II.5.1.1. Préparation des solutions de dNTPs: Voir II.2.....	81
II.5.1.2. Préparation des solutions d'amorce.....	81
II.5.1.3. Première amplification	82
II.5.1.4. Deuxième amplification	82
II.5.1.5. Electrophorèse	85

II.5.1.6. Digestion enzymatique des codons 437 et 540 du gène DHPS	85
II.5.2. La MS-PCR (PCR de mutations spécifiques) pour le gène DHFR	87
II.5.2.1. Préparation des solutions de dNTPs :	87
II.5.2.2. Préparation des solutions d'amorce ou « primer »	87
III.5.2.3. Première amplification	89
II.5.2.4. Deuxième amplification	91
II.5.2.5. Electrophorèse	93
<i>Chapitre II : Résultats</i>	95
I. Caractéristiques de la population étudiée	95
I.1. Résultats parasitologiques	95
I.2. Répartition des patients selon le sexe	96
I.3. Répartition des patients selon le site	97
II. Efficacité de l'amplification des gènes DHFR et DHPS	98
II.1. Efficacité de l'amplification du gène DHFR	99
II.1.1. Efficacité de l'amplification du codon 108	99
II.1.2. Efficacité de l'amplification du codon 59	100
II.1.3. Efficacité de l'amplification du codon 51	101
II.2. Efficacité de l'amplification du gène DHPS	101
II.2.1. Efficacité de l'amplification du codon 437	101
II.2.2. Efficacité de l'amplification du codon 540	102
III. Haplotypes des mutations des gènes DHFR et DHPS	103
III.1. Combinaison des mutations des gènes DHFR et DHPS en fonction du codon et du site	104
<i>Chapitre III : Discussion</i>	110
<i>Conclusion</i>	
<i>Résumés</i>	
<i>Références Bibliographiques</i>	
<i>Annexes</i>	

INTRODUCTION

Le paludisme est une maladie grave qui est responsable de la plus importante mortalité en Afrique Sub-saharienne.

C'est la principale cause de mortalité chez les moins de cinq ans en Afrique (20%) et il représente 10% de la charge totale de morbidité du continent [70].

L'espèce *Plasmodium falciparum* est responsable de 80% de mortalité qui se produit en Afrique Sub-saharienne. Les enfants et les femmes enceintes sont les plus vulnérables [70].

Au Sénégal, la situation géographique et les conditions climatiques font que le paludisme y constitue une endémie majeure dans la presque totalité du pays [52]. C'est pour cette raison que le Sénégal s'est doté d'un Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) en 1995. Ce programme a inscrit dans ses activités prioritaires la surveillance de l'efficacité des antipaludiques et la prise en charge correcte des cas reposant sur l'administration de molécules antipaludiques efficaces et accessibles.

La chloroquine était un des médicaments les plus efficaces et accessibles jamais développés, utilisé pour le traitement et la chimioprophylaxie. Cependant la chimiorésistance de l'agent du paludisme grave s'est étendue en Afrique et dans le monde. La chloroquino-résistance de *Plasmodium falciparum* devient fréquente et augmente la mortalité paludéenne.

Le Sénégal a abandonné la chimioprophylaxie chez la femme enceinte par la chloroquine et a adopté une stratégie préventive dénommée : Traitement Préventif Intermittent (TPI) qui utilise la sulfadoxine-pyriméthamine (SP).

L'absence de méthode de prévention chez les enfants de moins de cinq ans a incité la communauté scientifique à évaluer le traitement préventif intermittent sur ce groupe. C'est ainsi qu'en partenariat avec l'UNICEF et

certain bailleurs de fond, le service de Parasitologie de la Faculté de Médecine du Sénégal a mis en place une étude pilote du traitement préventif intermittent par la sulfadoxine-pyriméthamine chez les enfants de 2 à 11 mois dans 4 districts du Sénégal : Kédougou, Vélingara, Saraya et Tambacounda. Ceci dans le but de mesurer l'efficacité, la faisabilité et l'acceptabilité de cette stratégie.

Cependant l'utilisation importante de la sulfadoxine-pyriméthamine, augmente le risque d'apparition de souches résistantes.

C'est ainsi que nous nous sommes proposés de mesurer la prévalence des mutations des gènes DHPS et DHFR qui sont les gènes responsables de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine avant, le début de cette stratégie.

L'objectif général était de générer, dans le cadre de la recherche multicentrique, l'information nécessaire pour la révision des politiques et l'accélération de l'extension des programmes de contrôles du paludisme.

Les objectifs spécifiques étaient de :

- Mesurer la prévalence des marqueurs DHPS dans le district test de Tambacounda ;
- Mesurer la prévalence des marqueurs DHPS dans les districts témoins de Kédougou, Vélingara et Saraya ;
- Mesurer la prévalence des marqueurs DHFR dans le district test de Tambacounda ;
- Mesurer la prévalence des marqueurs DHFR dans les districts témoins de Kédougou, Vélingara et Saraya.

PARTIE I: Rappels bibliographiques

CHAPITRE I : Rappels sur le Paludisme

I. Généralités

Le paludisme est une maladie parasitaire potentiellement mortelle. Cette maladie est due à un parasite unicellulaire appelé *plasmodium*. Ce dernier est transmis d'une personne à l'autre par les piqûres d'un moustique, anophèle femelle qui a besoin de sang pour la maturation des ovaires.

Le paludisme touche aujourd'hui les régions tropicales et subtropicales et il est responsable chaque année de plus de 300 millions de cas de maladies aiguës et d'au moins un million de décès.

II. Définition

Le paludisme est une endémie parasitaire majeure due à l'introduction et à la reproduction dans l'organisme d'un protozoaire sanguicole du genre *Plasmodium*. Chez l'homme, ce parasite est transmis par la femelle d'un moustique du genre *Anopheles* dont un certain nombre d'espèces seulement sont de bons vecteurs du paludisme [14].

III. Epidémiologie

III.1. Agents pathogènes

III.1.1. Classification

Phylum des *Apicomplexa*

Classe des *Sporozoea*

Sous-classe des *Coccidia*

Ordre des *Eucoccidiidae*

Famille des *Plasmodiidae*

Genre *Plasmodium*

Espèces : - *P. falciparum*

- *P. malariae*

- *P. ovale*

- *P. vivax.*

Responsable des formes graves et mortelles, *Plasmodium falciparum* est plus répandu dans les régions tropicales chaudes. La prévention et le traitement du paludisme y sont devenus de plus en plus difficiles à cause de la chimiorésistance.

III.1.2. Cycle évolutif [14,45]

Il se fait chez deux hôtes : chez l'homme où s'effectue la multiplication asexuée ou schizogonique et chez l'anophèle femelle où se déroule le cycle sexué ou sporogonique.

➤ Cycle asexué ou schizogonie

Il se déroule en deux étapes : une étape hépatique et une étape sanguine.

- Le cycle pré- ou exo - érythrocytaire

Les sporozoïtes qui se trouvent dans les glandes salivaires de l'anophèle, injectés à l'homme avec la salive de l'insecte, pénètrent dans certaines cellules tissulaires. La voie qu'ils empruntent est encore inconnue. Cette masse multi nucléé, le corps bleu, éclate en libérant de nombreux mérozoïtes, après une incubation plus ou moins prolongée. La longueur de cette phase exo érythrocytaire et le nombre de mérozoïtes produits à l'intérieur d'une cellule infestée est caractéristique de chaque espèce de *Plasmodium*.

P. vivax et *P. ovale* possèdent des formes exo érythrocytaires appelées les hypnozoïtes, qui peuvent rester quiescentes dans le foie pendant une période qui peut durer cinq ans et produire ensuite des mérozoïtes qui envahissent les globules.

- La deuxième étape : elle est encore appelée cycle érythrocytaire

Les mérozoïtes pénètrent à l'intérieur d'une hématie et se transforment en trophozoïtes amiboïdes, émettant des pseudopodes et constitués d'un noyau, d'un cytoplasme et d'une vacuole. A l'intérieur de l'hématie, le parasite va produire du pigment, l'hémozoïne, aux dépens de l'hémoglobine. Il va ensuite se

diviser et donner 2, 4, 8... noyaux et prend alors le nom de schizonte. Le schizonte mûr se présente sous l'aspect d'un corps en rosace. Par éclatement de l'hématie, il libère des mérozoïtes qui vont parasiter d'autres hématies. Le cycle schizogonique érythrocytaire est bouclé. Le rythme de division asexué dans les hématies commande le rythme des accès fébriles, ces accès correspondant à l'éclatement de la majorité des rosaces.

Le cycle évolutif des *Plasmodium* est caractérisé par sa chronicité et sa périodicité. *P. vivax* et *P. ovale* se développent, de l'invasion par mérozoïtes à la rupture du globule rouge, en 48 heures. Ce sont les agents de la fièvre tierce bénigne. La schizogonie de *P. falciparum* dure habituellement 48 heures, parfois moins, provoquant une fièvre tierce maligne. *P. malariae* a une périodicité quarte, la rupture des globules rouges se produisant toutes les 72 heures.

Chez *P. falciparum* et *P. malariae*, la parasitémie découle de la réactivation de stades érythrocytaires préexistants : c'est la récurrence, qui se produit lors du déclin de l'immunité efficace.

➤ Le cycle sexué ou sporogonie

A un certain moment, des mérozoïtes pénètrent dans des hématies et se différencient en éléments sexués, encore appelés gamétocytes. Ces éléments mâles et femelles portent le nom de micro- ou macro gamétocytes. A ce stade, ils restent en attente dans le sang de l'homme où ils peuvent évoluer.

Leur absorption par l'anophèle femelle va permettre cette évolution. Après trois divisions, le micro gamétocyte donne naissance à 6 à 8 microgamètes. Le macro gamétocyte, après expulsion des globules polaires dans l'estomac de l'insecte, donne le macro gamète. Il y'a fécondation et formation d'un zygote mobile ou

ookinète. Ce zygote traverse la paroi du tube digestif et se place entre l'épithélium et la musculature où il se développe et s'arrondit, formant un oocyste. A l'intérieur de l'oocyste apparaissent des centaines de sporozoïtes fusiformes. La paroi de l'oocyste, qui fait hernie dans la cavité générale de l'insecte, se déchire et les sporozoïtes gagnent les glandes salivaires. Ce sont eux que l'insecte inocule à l'homme.

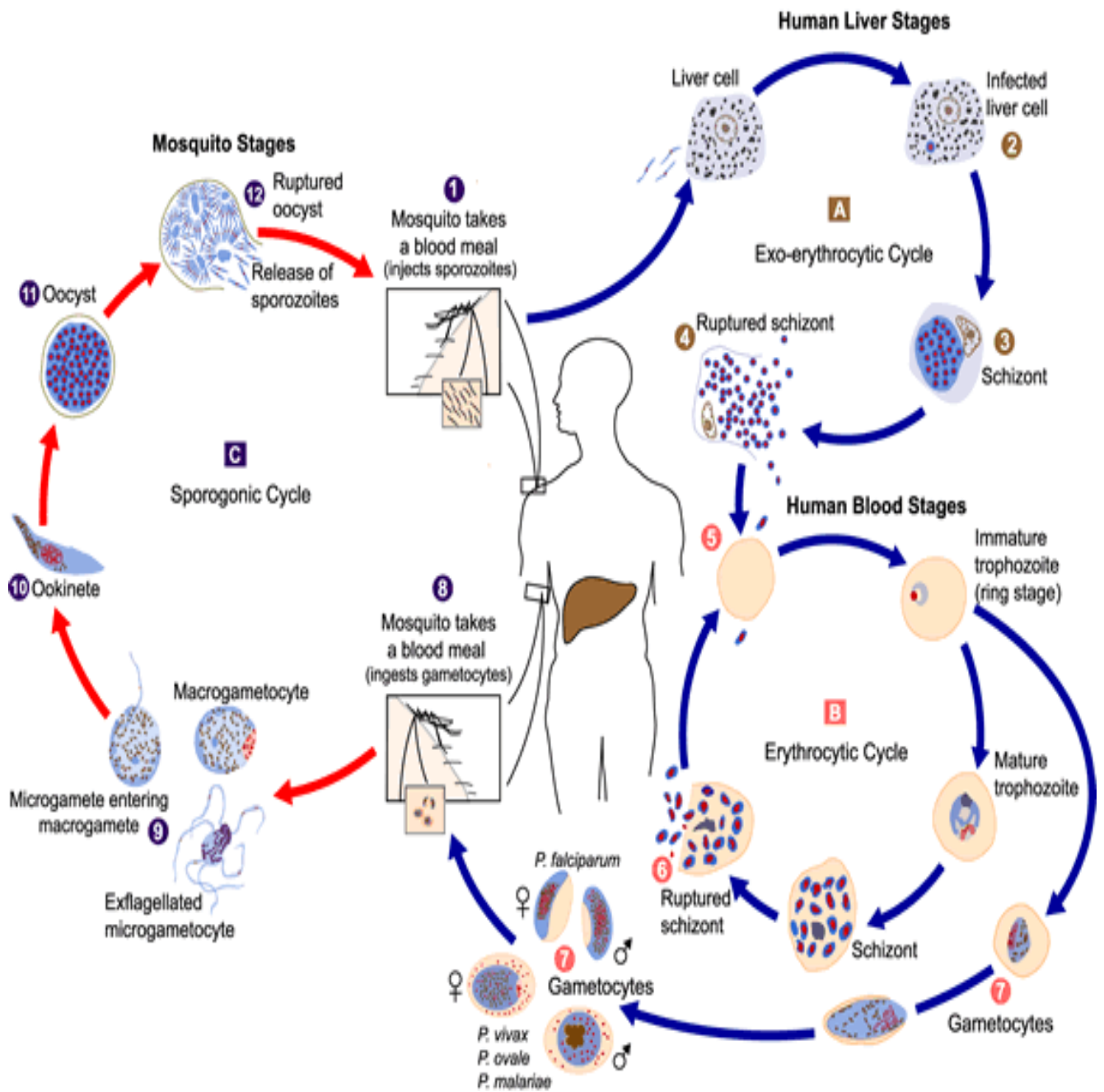


Figure 1 : Cycle de développement de *Plasmodium falciparum* [74]

III.1.3. Mode de contamination

La contamination du paludisme peut se faire par trois voies :

✓ Contamination par l'anophèle femelle : c'est le mode habituel de transmission du paludisme qui nécessite la présence simultanée de trois éléments indispensables à savoir le *Plasmodium*, l'anophèle femelle et les êtres humains.

✓ Contamination par transfusion de sang : elle est réalisée par injection de sang parasité contenant des Plasmodiums résultant d'une simple schizogonie. Ce mode de contamination est plus rare que le précédent. Il est rencontré dans le paludisme de seringue observé notamment chez les toxicomanes et dans les paludismes post-transfusionnels.

✓ Contamination par voie transplacentaire : c'est une transmission maternofoetale qui est d'autant plus fréquent que les plasmodiums sont particulièrement abondants dans le placenta. Ce mode de transmission est rare dans les zones endémiques.

III.2. Vecteur

La transmission du paludisme est assurée par des Arthropodes appartenant à l'ordre des *Diptères*, au sous-ordre des *Nématocères*, à la famille des *Culicidae*, à la sous-famille des *Anophelinae* et au genre des *Anopheles*.

La faune anophélienne au Sénégal est composée d'une vingtaine d'espèces [15]. Mais comme dans la plupart des autres régions de l'Afrique sub-saharienne, l'essentiel de la transmission du paludisme est assurée par les espèces du complexe *Anopheles gambiae* et *Anopheles funestus* [3].

IV. Facteurs favorisant la transmission

La température, l'eau, l'humidité et les phénomènes anthropiques constituent parmi les facteurs entraînant la transmission.

✓ La température : le cycle sporogonique des plasmodiums nécessite une température optimale qui se situe autour de 27 °C.

✓ L'eau et l'humidité : Les eaux stagnantes constituent des gîtes larvaires et l'humidité influe sur la longévité du vecteur qui diminue quand elle baisse.

✓ Les facteurs anthropiques : Les modifications du réseau hydrographique (barrage et irrigation) entraînent la prolifération des vecteurs. Le développement des transports favorisé par les mouvements des populations, entraîne une dissémination des vecteurs.

Les conditions socio-économiques défavorables, liées à la pauvreté, peuvent favoriser la transmission [55].

V. Faciès épidémiologiques

On appelle faciès épidémiologique une région ou un ensemble de régions où le paludisme présente dans ses manifestations pathologiques, des caractères communs liés aux modalités de transmission du parasite.

Le paludisme n'est pas une entité homogène à travers toute son aire de distribution, il varie selon les principaux faciès phytogéographiques: de la forêt primaire aux confins sahélo désertiques en passant par la forêt dégradée et les différentes savanes [45].

Le paludisme au Sénégal peut globalement être défini comme endémique stable à recrudescence saisonnière [16] avec un pic d'incidence noté entre septembre et novembre (figure 2).



Figure 2: faciès géographiques du Sénégal [72].

- Au nord, une zone sahélienne avec une pluviométrie depuis quelques années inférieure à 300mm par an. Dans cette zone, le paludisme est hypo endémique instable;
- Au centre, la zone soudano sahélienne se caractérise par une pluviométrie inférieure à 600mm par an. Le paludisme est endémique avec une recrudescence saisonnière;
- Au sud, la zone guinéo soudanienne se caractérise par une pluviométrie annuelle supérieure à 800mm et souvent même à 1000mm. Le paludisme y est de type hyper endémique, avec une recrudescence saisonnière.

➤ Sur une bande de 20km le long de la côte, de Dakar à Saint-louis; les Niayes constituent un système original. Dans ces dépressions inter dunaires, les collections d'eau sont pérennes et les habitants y pratiquent la culture maraîchère. Le paludisme est de type hyper endémique stable.

➤ En ville, sévit un paludisme de type urbain: la densité anophélienne est très faible et le paludisme y est de type hypo endémique à recrudescence saisonnière.

➤ Enfin le delta du fleuve Sénégal constitue un écosystème particulier: Avant la construction du barrage l'alternance de crue et de la décrue entraîne une incidence élevée du paludisme avec deux pics annuels, l'un en saison des pluies, l'autre en saison sèche pendant la décrue. Avec la mise en œuvre du barrage de Diama, le pic de saison sèche est maintenant observé pendant le premier trimestre de l'année.

VI. Clinique [14,45]

VI.1. Accès simples

Ils ne comportent pas de signe de malignité, mais peuvent à tout moment, évoluer vers l'accès pernicieux. La fièvre est le plus souvent continue vers 39°-40°C, rémittente avec plusieurs cloches dans la journée. C'est au bout de quelques jours qu'elle devient intermittente. Les accès thermiques sont irréguliers, survenant à peu près tous les deux jours.

Les frissons et sueurs sont habituels et les signes d'accompagnement sont marqués en particulier : malaise général intense, céphalées frontales, troubles digestifs.

Plasmodium vivax et *P. ovale* sont les agents de la fièvre tierce. Les accès surviennent toutes les 48 heures et diminuent progressivement d'intensité, s'espacent et finissent par s'arrêter tandis que se développe l'immunité. Ils sont généralement typiques, avec l'alternance classique des trois phases de frisson, de chaleur et de sueur. Et des accès de reviviscence (hypnozoïtes) sont observés au cours des deux années suivant la primo-infestation. Les fièvres sont qualifiées de bénignes car, même en l'absence de traitement, elles n'entraînent pas de complications.

Plasmodium malariae est l'agent d'une fièvre quarte dont les accès surviennent toutes les 72 heures. La durée d'évolution de ce paludisme peut être considérable, des récurrences apparaissent parfois 4 à 6 ans après le retour d'un pays d'endémie et même parfois beaucoup plus tard. Les néphrites quartanes sont une complication quelquefois observée, se traduisant par un syndrome néphrotique, dû à des dépôts d'immunoglobulines, de complément et d'antigènes plasmodiaux à la base des glomérules. Leur pronostic est réservé car elles évoluent malgré les traitements antipaludiques et corticoïdes.

Plasmodium falciparum provoque une tierce avec fièvre de primo-invasion plus sévère et plus longue et des accès avec intermittence souvent atypique. Le stade de sueurs manque généralement. La phase d'apyrexie est assez courte, parfois inexistante.

La fièvre tierce à *P. falciparum* est dite maligne en raison de son caractère pernicieux (neuropaludisme avec coma) chez le non prémuni. Sa durée d'évolution est assez courte. La perniciosité peut apparaître, même si le frottis sanguin est négatif, mais on n'observe généralement pas de récurrences. Elle s'observe chez l'enfant, l'expatrié nouvellement exposé à l'infestation, rarement chez l'adulte insuffisamment immunisé des régions impaludées. Le caractère de

gravité apparaît fort différent selon le terrain. Chez la femme enceinte, il peut provoquer l'avortement, l'accouchement d'enfants prématurés ou mort-nés.

VI.2. Accès pernecieux

L'accès pernecieux doit ses particularités symptomatiques à la multiplication intense des hématozoaires dans les capillaires cérébraux et viscéraux. Le début est souvent brutal, pouvant parfois succéder à un accès simple ou un paludisme viscéral évolutif non traité.

Le tableau clinique est celui d'un coma fébrile. La fièvre peut atteindre 40°C et même plus, le coma est plus ou moins profond. Des convulsions peuvent survenir surtout chez l'enfant de même que des troubles du tonus et des signes méningés.

A l'examen clinique, l'hépatomégalie est fréquente surtout chez l'enfant et la splénomégalie est absente deux fois sur trois.

Cet accès peut se compliquer d'insuffisance rénale organique parfois isolée et les surinfections pulmonaires sont fréquentes [26].

VI.3. Paludisme viscéral évolutif

Il survient chez les sujets soumis à des ré infestations répétées et insuffisamment prémunis. Il consiste en une anémie avec pâleur, dyspnée, asthénie, souffle anorganique, splénomégalie, amaigrissement et retard staturo-pondéral chez l'enfant.

VI.4. Fièvre bilieuse hémoglobinurique

Elle s'observe chez les sujets irrégulièrement traités par la quinine et la sensibilisation à la quinine a un effet déclenchant. Cette sensibilité pourrait même être, pour certains auteurs, la seule cause de fièvre bilieuse hémoglobinurique, sans que le parasite ne soit en cause. La crise se produit souvent en plein état de santé apparent. Elle débute par une poussée thermique à 40°C et par des frissons. Des vomissements alimentaires, puis bilieux, fréquents, apparaissent. Le malade est anxieux, le pouls rapide, les urines sont rouges puis noires. Un ictère s'installe. Lorsque les crises d'hémoglobinurie se succèdent, une anurie ou un état de collapsus surviennent. L'anémie est intense, l'azotémie est importante, la clearance de l'urée est diminuée. Le culot de centrifugation urinaire est formé de stromas globulaires et cylindres épithéliaux. Il n'y a pas de parasites apparents dans le sang circulant. C'est un véritable état de choc. Le malade meurt.

En zone d'endémie, le paludisme est autoentretenu par les infestations et réinfestations successives. Les parasites persistent dans les organes profonds et maintiennent une immunité généralement acquise dès l'enfance, immunité concomitante relative (prémunition) non stérilisante associée au développement d'une splénomégalie. L'hypersplénisme évolue selon l'âge parallèlement à la parasitémie dans les populations en zone d'endémie.

P. falciparum doit à la combinaison de plusieurs facteurs la sévérité de l'atteinte qu'il provoque.

Ces facteurs sont :

- la rapidité d'apparition de l'infection sanguine

- la massivité de l'infection, les rosaces à 24 mérozoïtes et le cryptozoïte hépatique pouvant libérer 50000 mérozoïtes dans la circulation sanguine (100000 seulement chez *P. vivax*)
- le déroulement de la plus grande partie de la phase sanguine dans les capillaires des organes profonds, l'encéphale en particulier, occasionnant des thromboses capillaires par agglutination.

Mais la durée de vie d'une souche de *P. falciparum* est, par contre, courte par rapport à celle des autres espèces. Et la simple positivité d'un prélèvement sanguin pour *P. falciparum* n'est pas prédictive de maladie palustre, en particulier chez les enfants. Il est nécessaire en effet de connaître la température et la densité parasitaire sanguine pour savoir s'il s'agit d'une simple infestation asymptomatique ou d'un véritable accès.

Tableau 1: Définition d'un Paludisme à *P. falciparum* grave ou compliqué d'après l'OMS (2002)

Présence de formes sexuées de <i>Plasmodium falciparum</i> dans le sang (GE et frottis positifs) et d'une ou plusieurs des manifestations suivantes	
01	Neuropaludisme. (coma stade II ou plus)
02	Crises convulsives généralisées répétées (plus de 2 /4 heures, plus de 15 mn de phase post-critique)
03	Anémie grave (hémoglobine < 6g / dl. Et hématocrite < 20%)
04	Insuffisance rénale (diurèse < 400 ml ou 12 ml / kg / 24h ; créatininémie > 265 µmol / l)
05	Œdème pulmonaire (ou syndrome de détresse respiratoire)
06	Hypoglycémie (< 2 mmol / l ou 0,4 g / l)
07	Collapsus respiratoire
08	Hémorragie diffuse (ou CIVD)
09	Hémoglobinurie massive
10	Acidose sanguine (pH artériel < 7,25 ou bicarbonates < 15 mmol / l)
11	Obnubilation ou prostration (coma stade I)
12	Parasitémie élevée (> 5% chez un sujet non immun)
13	Ictère clinique
14	Hyperthermie (> 41°C) ou hypothermie (< 36°C)
<p>SIGNES GENERAUX DE DANGER CHEZ LES ENFANTS DE MOINS DE 5 ANS</p> <ul style="list-style-type: none"> - Incapacité de boire ou de téter - Vomissements incoercibles - Léthargie ou inconscience - Convulsions ou antécédents de convulsions - Malnutrition sévère 	

VII. Diagnostic biologique

Beaucoup de méthodes sont utilisées pour diagnostiquer le paludisme et parmi celles-ci nous pouvons citer :

Le frottis sanguin, la goutte épaisse, le test Quantitative Buffy Coat (QBC), la Polymerase Chain Reaction (P. C. R.) et le test rapide de diagnostic.

VII.1. Frottis sanguin

On procède à un étalement monocellulaire en couche mince séchée. Le frottis sera ultérieurement fixé à l'alcool méthylique. Il répond à trois questions ; espèces plasmodiale en cause, stade parasitaire et parasitémie. L'inconvénient est l'augmentation du temps de lecture avec les parasitémies faibles.

VII.2. Goutte épaisse

Elle nécessite 24 heures de séchage. Elle permet de concentrer les parasites s'ils sont peu nombreux sur une petite surface ce qui permet de les voir plus facilement au microscope et de dépister une parasitémie faible.

Ces deux types de diagnostic constituent les techniques de référence.

VII.3. Q. B. C. test

Le sang recueilli sur un tube à hématocrite contenant l'acridine orange, est centrifugé à 1200 tours par minute pendant 5 minutes, puis l'identification est faite par lecture au microscope à fluorescence.

VII.4. Polymerase Chain Reaction (P.C.R.)

Elle repose sur la recherche de l'ADN parasite par amplification du matériel génétique. Cependant son coût élevé limite sa diffusion pour un diagnostic de routine.

VII.5. Tests de Diagnostic Rapide (TDR)

Il s'agit de cassettes de détection prêtes à l'emploi qui permettent en quelques minutes et sans matériel particulier de mettre en évidence la présence de *Plasmodium*.

C'est une méthode immuno-chromatographique qui utilise des anticorps monoclonaux fixés sur des bandelettes de nitrocellulose dirigés contre les antigènes ou les enzymes du *Plasmodium*.

Le diagnostic est positif quand on a la présence de deux bandes au niveau de la cassette.

VIII. Traitement du paludisme

VIII.1. Traitement curatif

Il est basé sur l'utilisation de médicaments actifs sur les plasmodies. De nombreux médicaments peuvent être utilisés et selon leur mode d'action, on peut les classer en deux groupes : les schizonticides et les gamétocytocides.

VIII.1.1. Schizonticides

Ils se concentrent fortement dans les hématies parasitées pour agir au niveau du noyau de l'hématozoaire plus exactement sur l'ADN dont ils inhibent la réplication, bloquant ainsi la schizogonie. On peut distinguer d'après leur mode d'action: Les schizonticides d'action rapide qui tuent le parasite dans l'hématie (Quinine, Artémisinine et dérivés, Chloroquine, Amodiaquine, Halofantrine, Mefloquine) et les schizonticides d'action lente qui inhibent la croissance du parasite en bloquant la division de son noyau (Anti foliques et Antifoliniques). On peut les regrouper également en schizonticides naturels et de synthèse.

VIII.1.1.1. Schizonticides naturels

➤ La quinine

Antipaludique naturel, c'est le médicament de première intention dans les indications d'urgence à cause de sa rapidité d'action.

➤ L'Artémisinine et ses dérivés (Ester et Ether)

La dihydroartémisinine (DHA) est indiqué dans l'accès palustre simple à *P. falciparum*. L'Artémether agit en détruisant rapidement les plasmodiums par blocage de la digestion de l'hémoglobine. L'Artésunate est efficace contre les souches multi résistantes de *P. falciparum* et est dénué d'activité hypnozoïtique.

VIII.1.1.2. Schizonticides de synthèse

➤ Les amino-4-quinoléines

- La Chloroquine, était le médicament le plus utilisé en première intention dans le traitement de l'accès palustre simple.

- L'Amodiaquine : elle inhibe la réplication de l'ADN après s'être intercalée au niveau des brins de la double hélice.

➤ Les Aryl-Amino-Alcools

- La Méfloquine : elle est active sur les schizontes érythrocytaires des quatre espèces plasmodiales humaines.

- L'halofantrine : il est utilisé uniquement en traitement curatif et déconseillé pour la femme enceinte et l'enfant de moins de 10 kg.

➤ Les Anti métabolites

- La Sulfadoxine : elle est dirigée contre l'acide folique, c'est un inhibiteur du dihydroptéroate synthétase (DHPS). Elle renforce l'action antimalarique de la pyriméthamine. Elle est à la fois un antibactérien et un antipaludique.

- La Pyriméthamine et le Proguanil : Ce sont des inhibiteurs de la dihydrofolate réductase (DHFR) empêchant ainsi la transformation de l'acide dihydrofolique en acide tetrahydrofolique conduisant à l'acide folinique, métabolite indispensable à la croissance du parasite intra globulaire.

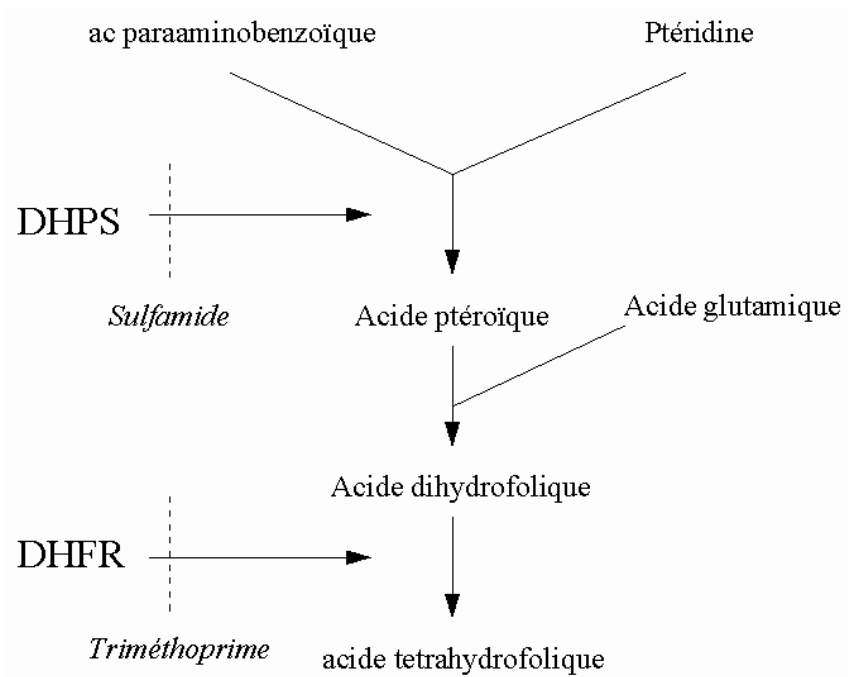


Figure 3 : Schéma du mécanisme d'action des antimétaboliques

➤ Les Associations schizontocides

- Sulfadoxine + Pyriméthamine + Amodiaquine
- Sulfaméthopyrazine + Pyriméthamine
- Dapsone + Pyriméthamine
- Sulfadoxine + Pyriméthamine + Méfloquine
- Chloroquine + Proguanil
- Atovaquone + Proguanil
- Artésunate + Amodiaquine
- Artésunate + Méfloquine
- Artémether + Luméfantrine
- Dihydroartémisinine + Pipéraquline

VIII.1.2. Gamétocytocides

Ils sont actifs sur les gamétocytes sanguins, mais aussi sur les formes intra hépatiques. Ils empêchent la transmission de l'espèce plasmodiale au moustique par rupture du cycle sporogonique. Ce sont surtout les amino-8-quinoléines (Primaquine^R) qui agissent en inhibant la transformation des gamétocytes du sang humain en gamètes chez l'anophèle. Elles permettent d'éviter la contamination des anophèles en stérilisant les réservoirs de parasites humains.

VIII.2. Traitement préventif

VIII.2.1. Traitement Préventif Intermittent (TPI) avec la sulfadoxine-pyriméthamine (SP)

Au Sénégal jusqu'en 2002, c'était la chimioprophylaxie à la choroquine qui était recommandée. Mais des limites ont été observées du fait d'un défaut d'observance et de chimiorésistance croissante.

En juin 2003 la conférence de consensus a recommandé l'adoption du traitement préventif intermittent par la SP chez la femme enceinte. Cependant pour les enfants de moins de cinq ans aucune stratégie n'est adoptée.

VIII.2.1.1. Traitement préventif intermittent chez la femme enceinte

Le TPI chez la femme enceinte consiste à administrer une dose thérapeutique d'un antipaludique efficace au cours des visites systématiques dans les services de consultation prénatale en commençant dès l'apparition des mouvements

actifs du fœtus. Actuellement le médicament utilisé dans la plus grande partie de l'Afrique est la sulfadoxine- pyriméthamine (SP). Deux doses thérapeutiques de SP sont administrées durant la grossesse : la première est faite à la seizième semaine d'aménorrhée ; la deuxième se fait au deuxième trimestre entre la vingt-huitième et la trente-quatrième semaine d'aménorrhée. Une troisième dose à un mois d'intervalle de la deuxième sera administrée à la femme enceinte séropositive au VIH.

L'administration est faite sous observation directe lors des consultations prénatales par l'agent de santé : c'est la stratégie du TDO (Traitement Directement Observé). La SP est bien tolérée pendant la grossesse si elle est administrée à partir du deuxième trimestre. Cependant elle est contre-indiquée pendant le premier trimestre de la grossesse. Par ailleurs compte-tenu de sa durée de vie longue, la SP ne doit pas être administrée plus d'une fois par mois.

Dans les zones où il a été appliqué, le TPI/SP s'est montré efficace avec notamment une nette réduction de l'anémie maternelle et des petits poids de naissance. Au Mali, Kayentao [39] mettait en évidence une diminution significative de l'anémie maternelle au cours du troisième trimestre : 40,4% chez les femmes sous TPI/SP contre 58,4% chez celles sous chimioprophylaxie hebdomadaire à la chloroquine. Il retrouvait également une réduction significative des petits poids de naissance : 24,3% chez les femmes sous TPI/SP contre 31% chez les femmes sous chimioprophylaxie. Au Malawi, une étude retrouvait également cette réduction de l'anémie maternelle et des petits poids de naissance. Elle établissait aussi le bénéfice de doses multiples (2 ou plus) par rapport à une seule dose.

Cependant des études faites au Malawi et au Sénégal font état de l'apparition et de la progression rapide de la résistance à la SP [47,12]. D'où la nécessité de tester des molécules alternatives.

Outre le TPI/SP, l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides est un volet fondamental de la prévention du paludisme chez la femme enceinte [13].

VIII.2.1.2. Traitement préventif intermittent chez les enfants de moins de cinq ans

Le paludisme reste la principale cause de mortalité et de morbidité chez les jeunes enfants dans les communautés pauvres en Afrique. On estime aux alentours de 190000 à 974000 le nombre de mort causé par le paludisme associé à l'anémie par an.

Le paludisme est l'une des principales causes d'anémie chez les enfants en Afrique sub-saharienne, représentant approximativement 18% en handicap et en perte de vie dû à l'anémie.

Le contrôle du paludisme ainsi que de l'anémie va dépendre en grande partie de la détection précoce de la maladie et d'un traitement adéquat.

Deux récentes études menées en Tanzanie, dans des zones de transmission pérenne du paludisme, ont montré que l'administration d'antipaludéens durant l'enfance, (que l'enfant présente ou pas un palu, Traitement Préventif Intermittent), réduit de façon significative l'incidence du paludisme et de l'anémie [44].

Au Sénégal Cissé et al ont observé une protection de 86% contre les cas de paludisme associé à l'anémie en administrant les trois doses de sulfadoxine-

pyriméthamine plus de l'artésunate à des enfants de moins de cinq ans pendant la période de transmission du paludisme. Cette stratégie a été appelée TPI saisonnier. Des résultats similaires ont été obtenus au Mali [19].

Le Traitement Préventif Intermittent chez les nourrissons de 3 à 11 mois (TPI-n) est une nouvelle stratégie en cours d'évaluation. Il utilise également la sulfadoxine-pyriméthamine et, est couplé au PEV (Programme Elargi de Vaccination).

Les enfants qui sont vaccinés en stratégie fixe, avancée ou mobile pour le Pentavalent 2, le Pentavalent 3 et les vaccins Rouvax et Fièvre jaune, reçoivent une dose de sulfadoxine-pyriméthamine (SP ½ comprimés).

Au Ghana, une étude a montrée l'efficacité du TPI-n dans le paludisme associé à l'anémie, avec une protection de 53% contre 22,8% pour le groupe placebo. Il a été aussi démontré que les enfants recevant les doses 1 et 2 durant la saison humide et, la dose 3 durant la saison sèche avaient un maximum de protection contre l'anémie soit 52% et le paludisme soit 72%.

Cependant la même étude a montré qu'une protection moins bonne a été obtenue en donnant la dose 2 durant la saison des pluies et la dose 1 et 3 durant la saison sèche (37%). Une protection de 24% a été obtenue en administrant les 3 doses durant la saison sèche.

Il est recommandé l'utilisation de moustiquaires imprégnées qui, associées au TPI-n permettent une réduction de 97% de l'incidence du paludisme [33].

IX. Prophylaxie [14, 45, 71]

L'activité nocturne des anophèles est maximale en milieu de nuit et plus forte en zone rurale. Se protéger du paludisme consiste d'abord à éviter les piqûres des moustiques du genre anophèle, essentiellement du complexe *Anophele, gambiae*, vecteur de la transmission du paludisme en Afrique sub-saharienne. À cet égard, on peut recourir à différentes méthodes de protection individuelle et générale.

IX.1. Lutte anti-vectorielle

Protection mécanique et physique :

La moustiquaire demeure un moyen privilégié afin de protéger l'individu contre les piqûres d'anophèles dans son sommeil nocturne. Parallèlement à la protection individuelle, la lutte antivectorielle doit également préconiser des mesures de prévention générale, notamment l'assainissement du milieu et l'assèchement des eaux stagnantes servant de gîtes aux larves des anophèles vecteurs.

Protection chimique :

La protection chimique individuelle est fondée sur :

- l'utilisation d'insecticides domiciliaires (bombes aérosols, tablettes, plaquettes diffusantes, serpentins et herbes fumigènes) ;

- l'utilisation d'insectifuges ou de répulsifs sur la peau ou sur les vêtements (crèmes, laits, lotions, gel) à la tombée de la nuit ;

- la possibilité d'imprégner les moustiquaires d'insecticides pyréthrinoïdes (deltaméthrine, perméthrine) qui renforcent ainsi son efficacité. D'autres matériels traités par les insecticides sont également préconisés : grillages fins aux ouvertures des portes et des fenêtres et autres barrières (couvertures, rideaux).

Quant aux mesures chimiques de protection générale, elles sont fondées sur : la lutte antilarvaire par des méthodes biologiques ou chimiques ; la lutte contre les anophèles adultes (insecticides à effets rémanants) et la lutte antiplasmodiale chez l'homme.

IX.2. Chimio prophylaxie

L'OMS préconise actuellement la chimio prophylaxie pour les groupes de population les plus à risque dans les zones où le risque de transmission palustre est élevé. En zones d'endémie, les femmes enceintes, surtout les femmes primigestes, sont les plus concernées depuis la première consultation prénatale jusqu'au deuxième mois après la naissance, afin de les protéger elles-mêmes et de protéger les enfants qu'elles portent. Les risques élevés encourus par les femmes enceintes vont de l'augmentation de la morbidité de l'enfant et des avortements, à l'augmentation de la prévalence de l'infection ou à une exposition du fœtus aux différentes chimio prophylaxie . En revanche, la chimio prophylaxie chez l'enfant n'est plus conseillée de façon à ne pas gêner l'acquisition de l'immunité et à ne pas favoriser l'émergence de souches plasmodiales chimiorésistantes. En revanche, elle reste indiquée à titre individuel chez un certain nombre d'enfants : enfants dont le poids de naissance est faible (prématurés, hypotrophes) ; enfants atteints de malnutrition ; enfants ayant

présenté une convulsion fébrile dont on sait le risque de récurrences fréquentes lors d'un épisode fébrile ultérieur ; enfants chez lesquels on découvre une splénomégalie et/ou une hépatomégalie pouvant entrer dans le cadre d'un paludisme viscéral évolutif et, enfin, enfants présentant une anémie sévère ou qui doivent être opérés.

Chapitre II : Chimiorésistance

I. Définition

La chimiorésistance dans le paludisme a été définie par l’OMS comme «l’aptitude d’une souche de parasite du paludisme à survivre ou à se multiplier malgré l’administration et l’absorption d’un médicament employé à des doses égales ou supérieures aux doses ordinairement recommandées mais comprises dans les limites de tolérance du sujet». Elle se démontre par des contrôles parasitologiques associées à la vérification d’une concentration sanguine efficace du médicament ou par la culture in vitro des parasites (antipaludogramme), qui mesure le niveau d’action du médicament sur un cycle de multiplication (48h pour *Plasmodium Falciparum*).

Quatre facteurs ont été jusqu’ici mis en cause dans l’émergence des résistances de *P.falciparum* aux antipaludiques dans une zone donnée.

II. Facteurs favorisant la chimiorésistance

On entend par paludisme polychimiorésistant, une résistance à plusieurs antimalariques observée chez *P.falciparum*. Cette résistance peut être croisée ou simultanée.

II.1. Pression médicamenteuse et la sélection des mutants

Dans une zone d'endémie palustre, les premiers parasites mutants qui apparaissent sont généralement très peu nombreux par rapport aux parasites sauvages. Selon la loi des équilibres biologiques, leur nombre reste longtemps peu élevé en l'absence d'intervention de facteurs extrinsèques. Dans cette zone, l'utilisation d'un médicament aura pour conséquence l'élimination des plasmodies sensibles, ce qui va faire rompre l'équilibre en faveur des mutants résistants. C'est la pression médicamenteuse qui permet l'émergence des mutants préexistants et non l'adaptation progressive des parasites à des doses croissantes du produit.

II.2. Degré d'immunité de la population

L'immunité (cellulaire et humorale) agit de manière similaire aussi bien sur les isolats sensibles que résistants à un médicament. Dans une zone où la transmission du paludisme est continue, le degré d'immunité de la population est élevé et les mutants résistants qui échappent à l'action du médicament sont attaqués par les facteurs de l'immunité. Si le niveau d'immunité est insuffisant (sujets expatriés, jeunes enfants non encore immunisés, adultes en état de déficit immunitaire.), les mutants résistants se multiplieront et engendreront des manifestations cliniques.

II.3. Voyages

Un voyageur non immun va emporter des mutants résistants d'une zone de chimiorésistance vers une zone où ces mutants résistants n'existaient pas. Les sujets non immuns et non prémunis de cette zone d'accueil vont permettre le développement et la dissémination de ces mutants résistants et contribuer à l'expansion de la résistance.

III. Mécanismes de la résistance aux antipaludiques

III.1. Mécanismes de la résistance à la Sulfadoxine-pyriméthamine (SP)

Le rôle essentiel des antifoliques est de permettre une potentialisation des antifoliniques. La résistance à ces composés est due à une modification de l'enzyme dihydroptéroate synthétase (DHPS) [42].

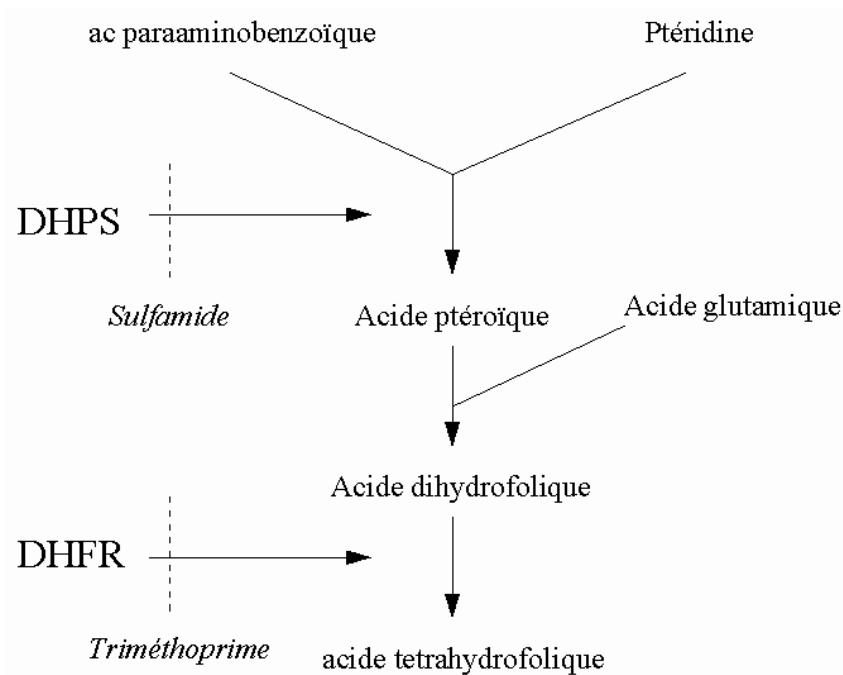


Figure 3 : Schéma du mécanisme d'action des antimétaboliques

La résistance aux sulfamides est le fait de mutations ponctuelles qui surviennent dans le gène DHPS et correspond à des mutations des codons 436, 437, 581. Cette résistance augmente avec des mutations additionnelles au niveau des codons 540 et 613 [67, 62].

Les bases moléculaires de la résistance aux antifoliques, comme la SP, sont bien caractérisées. Chez *P.falciparum*, la résistance à la SP est essentiellement acquise à la suite de mutations ponctuelles successives notamment celle qui intervient au niveau du codon 108 de la DHFR parasitaire, gène codant pour la dihydrofolate réductase, l'enzyme cible de la SP [5]. En plus de la mutation du codon 108, des mutations additionnelles qui affectent les codons 51, 59 et rarement le codon 16 et 164 élèvent le niveau de résistance [5].

III.1.1. Mutations du gène DHFR

La DHFR est le produit d'expression d'un gène situé sur le chromosome 4 du génome plasmodial.

Les mutations ponctuelles du gène PfDHFR sont les bases moléculaires de la résistance de *P.falciparum* à la Pyriméthamine [64]. Les isolats de *P.falciparum* provenant d'échecs thérapeutiques à la S/P présentent une résistance in vitro à la pyriméthamine.

La substitution **S108N** (remplacement de la sérine N° 108 par une asparagine) est la mutation primaire associée à la résistance à la pyriméthamine et au cycloguanil en Afrique et en Asie du Sud-est. En Amérique du sud, on rencontre également la substitution **S108T** (remplacement de la sérine N° 108 par une Thréonine) [49]. Les mutations additives les plus fréquentes sont **N51I** (remplacement de l'asparagine en position 51 par l'isoleucine) et **C59R** (remplacement de la cytosine en position 59 par l'arginine).

Une simple substitution Asparagine en 108 ou Thréonine en 108 sur le dihydrofolate réductase (DHFR) recombinante du parasite réduit l'affinité de la molécule sans affecter le fonctionnement de l'enzyme vis à vis de son substrat naturel. Les mutations multiples diminuent l'efficacité de l'enzyme sur le dihydrofolate, ce qui suggère que des mutations additionnelles soient défavorables aux parasites en l'absence de pression médicamenteuse [58]. La présence de la mutation S108N seule ou associée à une mutation du codon 59 n'est pas suffisante pour entraîner une résistance. Par contre, la présence de trois mutations au niveau du gène DHFR entraîne un échec thérapeutique tardif ou précoce. Dans ces conditions physiologiques, la concentration sanguine en folates peut influencer l'effet de la sulfadoxine, ceci pouvant expliquer les

échecs du Fansidar^R sur des isolats de *P.falciparum* avec la seule mutation **S108N** sur pfDHFR.

III.1.2. Mutations du gène DHPS

La DHPS est une enzyme dont le gène est situé sur le chromosome 8 et contient deux introns.

Il a été initialement évoqué que des mutations sur le gène de la dihydroptéroate synthétase (pfDHPS, la cible des antifoliques) pourraient être responsable de la résistance à la sulfadoxine [59]. Des mutations ponctuelles des codons 436, 437, 540, 581 ou 613 sont associées à des diminutions de sensibilité à la sulfadoxine [64,65].

Le codon 436 apparaît comme tétra morphique, avec possibilité de substitution de Sérine (espèce sauvage) par Alanine (Ala), Phényl- alanine ou Cystéine. Pour le codon 613, le trimorphisme est observé avec substitution de Ala par Ser ou Thr. Les positions 437, 540 et 581 se montrent dimorphiques. Les codons 437 et 581 peuvent avoir une substitution de Ala par Gly tandis que le codon 540 muté présente Glu à la place de Lys. La mutation la plus couramment retrouvée est **A437G**. Les mutations affectant les positions 436, 437 et 540 peuvent se produire seules. Les données suggèrent que la mutation **A581G** est toujours associée à la mutation **A437G** et que la mutation **A613S/T** est couplée aux changements dans l'un ou l'autre résidu 436 ou 437, reflétant vraisemblablement les contraintes stériques de cette enzyme.

La résistance à l'association sulfadoxine-pyriméthamine est en relation avec une double ou triple mutation au niveau du gène DHFR (Asn108 et Ile51 et/ou Arg59) et un gène DHPS sauvage ou mutant (Gly437; Glu540) [64,65]

Le développement de la résistance à la Sulfadoxine Pyriméthamine par *Plasmodium falciparum* constitue un problème majeur pour le traitement effectif du paludisme. Le développement de la résistance aux médicaments peut être catégorisé en trois stades [48].

- Le premier est la sélection des parasites présentant des mutations génétiques dans les gènes dihydrofolate réductase (DHFR) ou dihydroptéroate synthétase (DHPS). Cette sélection est due à la longue demi-vie de la combinaison Sulfadoxine-pyriméthamine.
- Le deuxième comprend la sélection de parasites ayant les allèles de souches hautement résistantes au cours de l'infection de l'hôte. La durée du traitement relatif à l'initiation d'une réponse exempte d'un antipaludique spécifique est un facteur important pendant ce stade. Il y va de même pour le dosage du traitement.
- Pendant le troisième stade, l'échec du traitement clinique devient prédominant du fait que les parasites développent suffisamment de mutations pour survivre aux doses thérapeutiques de la combinaison de médicaments (S/P).

Toutefois, la résistance à la combinaison SP se développe rapidement avec l'échec du traitement qui est relaté en Afrique, Asie, Indonésie et en Amérique du Sud. [9, 24, 36, 48, 63]. La Pyriméthamine et la sulfadoxine agissent en synergie pour inhiber dans le parasite deux enzymes importantes pour la biosynthèse des folates que sont la dihydrofolate réductase (DHFR) et la dihydroptéroate synthétase (DHPS) [48]. Des mutations ponctuelles dans les gènes DHFR et DHPS confèrent une résistance à la Pyriméthamine et à la sulfadoxine respectivement, avec une diminution de la sensibilité in vitro de *P.*

falciparum en relation avec le nombre de mutations de chaque gène [9, 66, 67]. Une relation a été faite entre les mêmes mutations et l'échec de traitement dans la mise en scène clinique [9, 12, 48, 11]; la présence de mutations dans le gène DHFR provoque un échec thérapeutique plus important que ceux du gène DHPS [9].

Bien que les bases moléculaires pour la résistance à la SP soient connues, les facteurs promouvant le développement et la transmission de ces mutants sont moins clairs.

Il a été suggéré que la pharmacocinétique [34], le recours excessif des médicaments, la résistance croisée entre médicaments, un traitement inadéquat à travers une prescription ou une administration inappropriée, ou une pauvre absorption [57, 68] contribuent au développement de la résistance. La durée relative du traitement par initiation d'une réponse immune par le patient est aussi une hypothèse importante; de même que les facteurs individuels interviennent dans le développement de la résistance [30].

III.2. Mécanismes de résistance de *P.falciparum* aux autres antipaludiques

III.2.1. Chloroquine

L'activité la plus spectaculaire de la chloroquine est sa capacité à se concentrer à partir de niveaux nanomolaires hors du parasite à des niveaux millimolaires dans la vacuole digestive du trophozoïte érythrocytaire. C'est à ce niveau qu'elle inhibe la digestion de l'hémoglobine et qu'elle se fixe à l'hématine [9].

La caractéristique commune des isolats résistants est une altération de l'accumulation de la chloroquine dans la vacuole digestive. Les théories dominantes suggéraient que ces défauts d'accumulations étaient dus à une altération des gradients de pH et/ou de la perméabilité membranaire en conséquence d'un mécanisme d'efflux. Il apparaît maintenant que la chloroquino-résistance implique une captation diminuée de la molécule.

Depuis quelques années, Pfcrt, un gène de 13 exons, a été identifié près de Pfcg2 sur le chromosome 7 [29]. Ce gène code pour une protéine de 424 acides aminés qui serait un canal ou transporteur permettant de traverser la membrane de la vacuole digestive. Une mutation du codon 76 associée à plusieurs autres mutations est présente chez tous les isolats résistants et, absents chez les isolats sensibles.

Des mutations ponctuelles de pfMDR1_{A86T} sont liées à la chloroquino-résistance en Afrique [5, 10]. L'allèle pfMDR1_{A86T} pourrait contribuer à la résistance à la chloroquine et à l'amodiaquine [21]. Lors d'expériences de recombinaison homologue, des gènes s'agrégeant avec la chloroquino-résistance ont été retrouvés chez *P.falciparum* [12]. Le gène PfCg2, situé sur le chromosome 7, code pour une protéine transmembranaire localisée dans la membrane de la vacuole parasitophore et dans celle de la membrane digestive [59]. Un polymorphisme complexe de ce second gène associé à la chloroquino-résistance est retrouvé dans les clones chloroquino-résistants africains de *P.falciparum* mais avec des exceptions [22].

Pays de la zone 2 avec chloroquinorésistance, le Sénégal abandonne en 2003 la chloroquine comme traitement préventif et curatif du paludisme. Ceci a eu une incidence positive sur la lutte contre le paludisme [75].

III.2.2. Autres antipaludiques

La résistance à la quinine, à la méfloquine et à l'halofantrine est probablement due à des mécanismes du type de ceux qui sont observés pour la chloroquine. A la différence de la chloroquine, ces composés n'expriment pas actuellement, de hauts niveaux de résistance et leur activité reste, selon les régions complète ou partielle.

On entend par paludisme polychimiorésistant, une résistance à plusieurs antimalariques observée chez *P.falciparum*. Cette résistance peut être croisée ou simultanée.

La résistance simultanée est principalement la conséquence d'une utilisation simultanée importante de plusieurs antipaludiques induisant une forte pression sélective. Ainsi, en Asie du Sud-est, à la résistance à la chloroquine, s'est ajoutée celle à la Sulfadoxine-Pyriméthamine à mesure que cette dernière relayait la chloroquine. Par contre en Afrique de l'ouest, la résistance à la chloroquine n'est pas encore associée à celle aux antifoliniques et la fréquence de la bi résistance SP/chloroquine est généralement égale au produit des fréquences individuelles de résistance [43].

La résistance croisée entre des antipaludiques est un phénomène lié à la communauté de leur mode d'actions et sans doute de leur mécanisme de résistance. Une corrélation étroite est observée entre la sensibilité au cycloguanil et à la pyriméthamine. Les parasites ayant atteint un haut niveau de résistance à la chloroquine, comme en Asie du Sud-est, sont généralement résistants à l'amodiaquine. Il en serait de même, dans cette région, entre la méfloquine et l'halofantrine [43].

IV. Methode d'évaluation de la chimiorésistance

Trois approches méthodologiques sont couramment utilisées pour analyser le phénomène de la résistance des parasites du paludisme aux médicaments [42]. Le test de l'efficacité thérapeutique (test in vivo), qui bien que non standardisé pour tous les antipaludiques, représente la méthode de base pour déceler la résistance.

Le test in vitro (antipaludogramme), qui contourne certaines difficultés du test in vivo, nécessite un minimum de formation des réalisateurs et un équipement onéreux pour les laboratoires du sud.

La biologie moléculaire représente une approche technique importante, car elle permet d'analyser les gènes impliqués dans la résistance.

IV.1. Test de sensibilité in vivo

Plusieurs tests d'efficacité thérapeutique ont été mis au point mais le plus utilisé actuellement, est celui de l'OMS de 1994 (OMS, 1994) modifié en 1996 (OMS, 1996) et en 2001 (OMS, 2002). C'est un test simplifié, standard de 28 jours de suivi dont l'interprétation tient compte des réponses cliniques et parasitologiques. Le test consiste à administrer à un sujet atteint d'un paludisme non compliqué à *Plasmodium falciparum* (infection mono spécifique), la dose ordinairement recommandée de l'antipaludique à étudier. Les contrôles cliniques et parasitologiques sont effectués à J2, J3, J7, J14 et J28. L'efficacité du traitement est exprimée en thème de réponse clinique et parasitologique adéquate (RCPA), en échec thérapeutique précoce (ETP) et en échec

thérapeutique tardif (ETT). Il permet le recueil des données cliniques et épidémiologiques sur le terrain.

Tableau 2: Classification des réponses au traitement

E T P		<p>-Apparition de signes de danger ou d'un paludisme grave aux jours 1, 2 ou 3, en présence d'une parasitémie</p> <p>-Parasitémie au J2 supérieur à celle du J0, quelque soit la température axillaire</p> <p>-Parasitémie au J3 avec température axillaire $\geq 37^{\circ}\text{C}$</p> <p>Parasitémie au J3 $\geq 25\%$ du J0.</p>
E T T	E C T	<p>-Apparition de signe de danger ou de paludisme grave après le jour 3, en présence d'une parasitémie, en l'absence préalable de tout critère d'Échec Thérapeutique Précoce.</p> <p>-Présence d'une parasitémie et température axillaire $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ (ou antécédent de fièvre) n'importe quand entre jour 4 et jour 28, en l'absence préalable de tout critère d'Échec Thérapeutique Précoce.</p>
	E P T	<p>-Présence d'une parasitémie n'importe quand entre jour 7 et jour 28 et température axillaire $<37,5^{\circ}\text{C}$, en l'absence préalable de tout critère d'Échec Thérapeutique Précoce ou d'Échec Clinique Tardif.</p>
R C P A		<p>-Absence de parasitémie au jour 28, quelle que soit la température axillaire, en l'absence préalable de tout critère d'Échec Thérapeutique précoce, d'Échec Clinique Tardif, ou d'Échec Parasitologique Tardif.</p>

IV.2. Tests de sensibilité in vitro (antipaludogramme)

Il existe actuellement plusieurs tests in vitro tels que le micro test de RIECKMAN (1968) adopté par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le test isotopique de DESJARDINS (1978), le semi-microtest de LE BRAS et DELERON (1983) et le DELI test de Brasseur. Légèrement différents par des détails techniques et par le mode d'interprétation, ces méthodes donnent des résultats corrélés.

Ces tests consistent à mettre en culture des parasites, aux stades trophozoïtes, en présence d'antimalarique à dose croissante et à étudier l'inhibition de leurs multiplications. L'activité antipaludique est appréciée en fin de test, soit par lecture microscopique (numération des schizontes sur goutte épaisse), soit par la mesure de l'incorporation d'hypoxanthine tritiée (Méthodes radio isotopiques) ou la mesure de la LDH (Lactae deshydrogenase) de *P. falciparum* (DELI test).

Les résultats sont exprimés en concentration inhibitrice 50% (CI50) qui représente la dose d'antipaludique pour laquelle on observe une diminution de moitié de la croissance obtenue dans les puits témoins (en l'absence d'antimalarique). Pour le DELI test, elle est évaluée par la diminution de 50 % de la densité optique comparativement à la densité optique du surnageant de culture des puits témoins.

IV.3. Génotypage moléculaire

Il représente une autre approche technique importante, car il permet d'analyser les gènes impliqués dans la résistance.

En pratique courante, la corrélation de modifications génétiques à un phénotype résistant nécessite le développement de techniques de biologie moléculaire relativement simples à mettre en œuvre, comme celles dérivées de la PCR (Polymerase Chain Reaction). Cette technique est le plus souvent utilisée dans le cadre des résistances de *P.falciparum* à la chloroquine et aux antimétabolites (particulièrement la pyriméthamine, la sulfadoxine et le cycloguanil), à la recherche de mutations des gènes DHFR et DHPS.

IV.4. Méthodes moléculaires

IV.4.1. PCR

Voir Volet pratique le XI.2.3.

IV.4.2. Dot blot

Le principe en est simple, il fait appel à l'utilisation des sondes synthétiques (oligonucléotides). L'échantillon d'ADN à analyser, purifié ou amplifié par PCR, est dénaturé (séparation des deux brins de la double hélice) puis déposé en tache (ou dot) sur un support solide (p. ex. une membrane de nylon chargée positivement). On doit toujours procéder à une étape d'hybridation avec des sondes marquées. La membrane est hybridée avec la sonde correspondante qui ne reste accrochée que sur la partie d'un gène ou

d'une séquence lui étant strictement homologue. Une série de lavages permet d'éliminer la sonde non fixée.

La révélation permet de mettre en évidence la présence de la sonde.

IV.4.3. Southern blot

Le Southern blot est une technique de transfert par capillarité de l'ADN à partir d'un gel d'agarose, créant ainsi sur une membrane (de nylon ou nitrocellulose) une réplique exacte de la migration électrophorétique dans le gel. L'ADN est, dans un premier temps, fragmenté grâce à une endonucléase de restriction qui coupe le gène en des sites spécifiques, reproductibles d'une molécule à l'autre et donnant un grand nombre de fragments de tailles différentes. La séquence recherchée se trouve sur un fragment donné dont la séparation se fait par électrophorèse en fonction de sa taille. Grâce à cette approche, on peut identifier des polymorphismes de restriction : toute mutation ou variation d'une des bases appartenant au site de reconnaissance de l'endonucléase entraîne l'inhibition de la coupure spécifique du brin d'ADN.

IV.4.4. Séquençage

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'enchaînement des nucléotides qui le constitue.

La méthode est fondée sur une synthèse enzymatique d'ADN complémentaire à un gabarit: l'échantillon à séquencer. Une ADN polymérase complète la chaîne de nucléotides à partir d'une amorce, en recopiant fidèlement le gabarit d'ADN simple-brin. L'amorce est un oligonucléotide de synthèse homologue à une région de la séquence cible.

Cependant, des analogues aux désoxynucléotides, substrats normaux de la polymérisation, ont été introduits dans le milieu réactionnel. Ce sont les di-désoxyribonucléotides qui, à chaque fois qu'ils sont introduits dans une chaîne en cours d'extension, bloquent toute addition ultérieure de nucléotide. La polymérisation est donc arrêtée après chaque incorporation de di-désoxynucléotide, produisant des fragments d'ADN de toutes les tailles possibles de base en base depuis l'amorce. En outre, le di-désoxynucléotide terminant chacun de ces fragments est connu. Il reste à évaluer la taille de chacun des fragments sur un gel d'électrophorèse à très haute résolution. Ceci équivaut à déterminer, par rapport à l'amorce, la position exacte où s'est arrêtée la polymérisation. Puisque le di-désoxynucléotide qui a été inséré à cet endroit est connu, il est facile de déduire la séquence du brin complémentaire à la matrice.

Deuxième partie : Volet pratique



Chapitre I : Matériel et Méthodes

Énoncé et justificatif de l'étude :

Au Sénégal le paludisme représente le premier motif de consultation (35%) dans les structures de santé. Les jeunes enfants malheureusement continuent de payer le plus lourd tribut de cette affection. En effet, à Niakhar, une zone rurale sénégalaise, il a été prouvé par le biais des autopsies verbales que le paludisme est la cause directe de 25% des décès chez les enfants âgés de 3 à 59 mois. Des résultats similaires (27%) ont été rapportés de la Gambie. De récentes études révèlent que jusqu'à 23% du taux de mortalité infantile des moins de cinq ans en Afrique, est attribué au paludisme, même si la plupart de ces morts ne sont pas diagnostiquées en tant que telles, mais plutôt comme de sévères troubles anémiques et respiratoires. Les résultats de l'essai clinique mené à Ifakara par D. Schellenberg et al, sur l'utilisation du TPI-n couplée au PEV chez les nourrissons, ainsi que les résultats d'une autre étude Tanzanienne par J. Massaga, suggèrent que le TPI-n est efficace dans la prévention et la lutte contre l'anémie et le paludisme chez les jeunes enfants. D'autres études cliniques en cours semblent abonder dans ce sens.

Au vu de ces résultats, le Ministère de la santé du Sénégal avec l'appui de l'UNICEF, de l'OMS et l'assistance technique du Service de Parasitologie de l'UCAD, a décidé de mettre en œuvre une étude de faisabilité du traitement préventif intermittent du paludisme chez l'enfant de 0 à 1 an dans les districts de Vélingara, Kédougou, Saraya et Tambacounda.

Situés au sud est du pays, dans une zone de transmission stable du paludisme, ces quatre districts constituent par ailleurs les zones d'intervention du programme de survie de l'enfant soutenu par l'UNICEF.

Avant la mise en œuvre de ce programme une étude de la prévalence du paludisme, de l'anémie, des marqueurs moléculaires de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la Sulfadoxine-Pyriméthamine chez les enfants de 12-23 mois était nécessaire afin de constituer une situation de base d'avant intervention.

I. Matériel

I.1. Zones d'études

I.1.1. District de Vélingara

Le district de Vélingara est situé au Sud - Est du Sénégal. Il est limité au Nord par la Gambie, au Sud par la Guinée Conakry et la Guinée Bissau, à l'Ouest par le département de Kolda et à l'Est par le département de Tambacounda. Sa superficie est de 5435 km², le climat est de type Soudano-guinéen, avec une pluviométrie de 1000 à 1200 mm.

I.1.2. District de Kédougou et celui de Saraya

Le district de Kédougou et de Saraya sont situés au Sud de la région de Tambacounda dont ils font partie. Ils sont limités : à l'Est par le Mali ; à l'Ouest par le département de Tambacounda ; au Nord par celui de Bakel et au Sud par la République de Guinée.

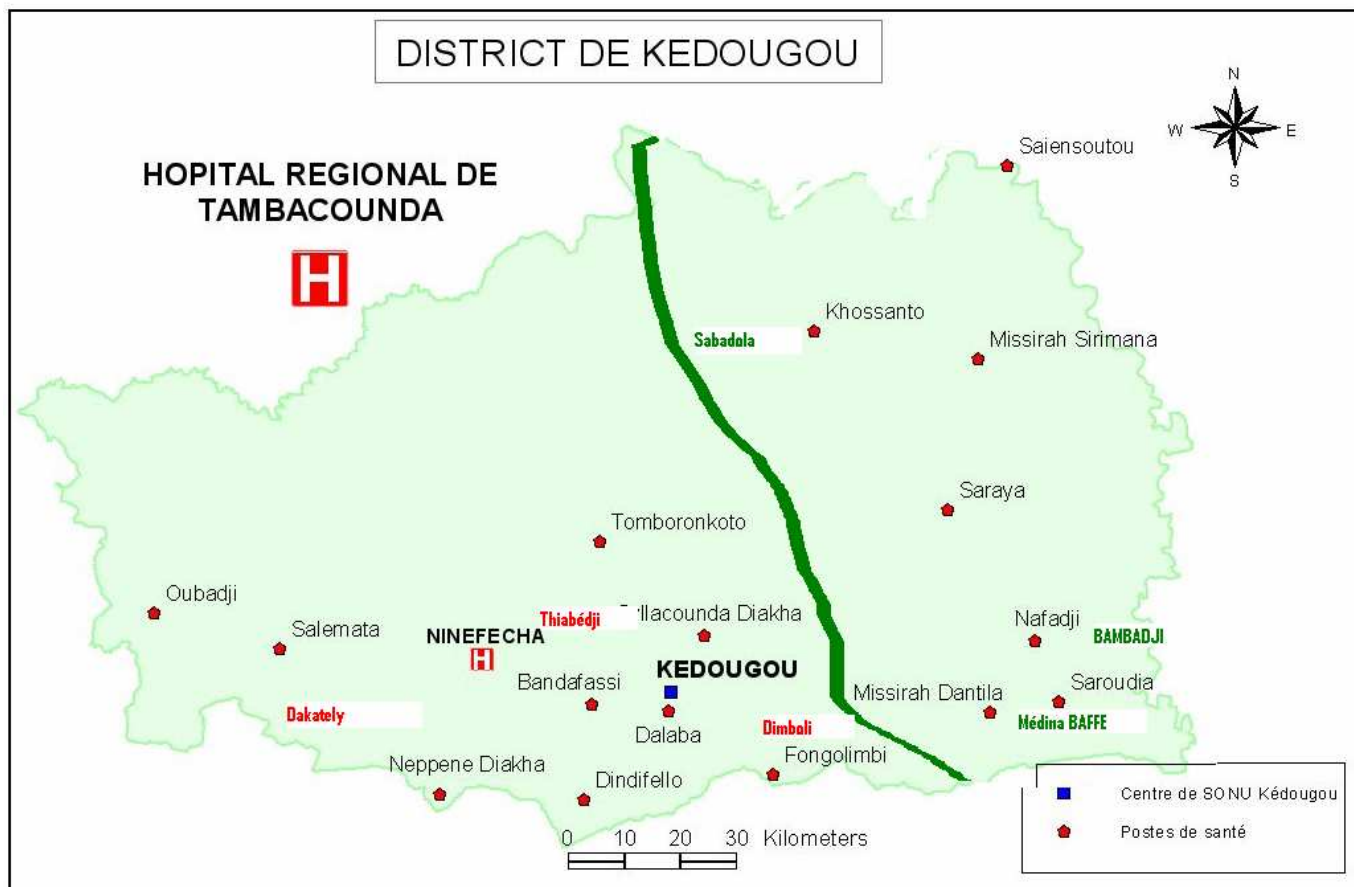


Figure 4 : Carte du district de Kédougou et de Saraya

I.1.3. District de Tambacounda

Le district de Tambacounda est situé au Sud du Sénégal, il est frontalier à la république de Gambie. Sa superficie est de 11 416 Km² le climat est de type Soudano-guinéen, avec une pluviométrie annuelle supérieure à 1000 mm.

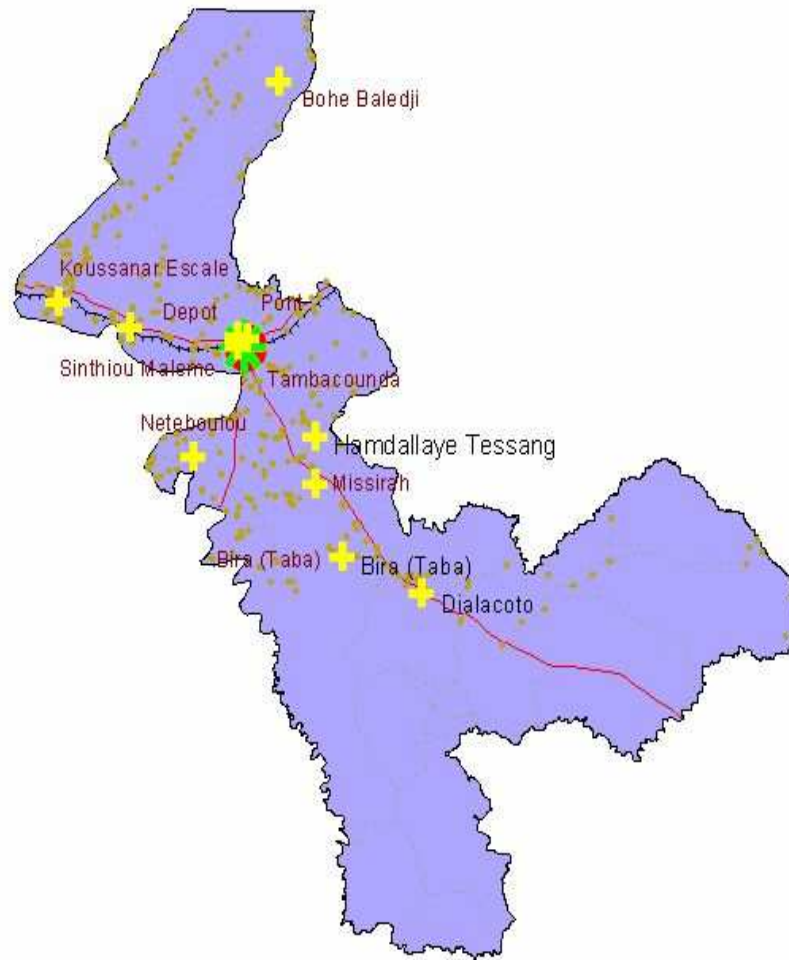


Figure 5 : Carte district de Tambacounda

I.2. Population étudiée

La population étudiée a été prélevée en Janvier 2007 dans les zones d'application de l'étude à savoir les districts test de Kédougou, Vélingara, Saraya et le district témoin de Tambacounda.

- Critères d'inclusion
 - Avoir entre 12 mois et 23 mois

- Présence ou non d'une température axillaire supérieure à 37.5°C.
- Obtention du consentement éclairé des parents ou de la personne responsable.
- Habiter dans la zone d'intervention pour les districts test et le district témoin
 - Critère d'exclusion
- Des signes généraux de dangers ou de paludisme grave à *Plasmodium falciparum*

I.3. Prélèvements

Une enquête civile a été menée en transversale avant les prélèvements proprement dits. Des gouttes épaisses et des frottis sanguins ont été effectués sur lames.

Quatre gouttes de sang sont recueillies sur les papiers filtres. Ces confettis sont séchés, scellés dans des sachets contenant du silicagel et gardés à l'abri de l'humidité. Les lames et les confettis sont ensuite acheminés au laboratoire de Parasitologie de l'UCAD pour réaliser notre étude.

Au laboratoire toutes les lames sont lues, les confettis correspondant aux lames positives vont alors subir l'analyse à la PCR.

I.4. Matériel et réactifs de laboratoire (Tableau 4)

Tableau 3 : Matériel et réactifs de laboratoire

	MATERIEL	REACTIFS
Goutte épaisse Frottis sanguin	1- Lames 2- Vaccinostyle stérile 3- Cotton 4- Microscope	1- Giemsa 2- Méthanol 3- Huile à immersion
Confettis	1- Papier adapté (papier filtre, Wattman 3MM, Iso code, etc.) 2- Gants 3- Vaccinostyle stérile 4- Coton hydrophile 5- Enveloppes 6- Marqueurs indélébile 7- Ciseaux 8- Poubelle 9- Blouses	1-Alcool 70° 2-silicagel
Extraction	1- Confettis, 2- Gants stériles, 3- Ciseaux, 4- Pipettes de 100, 200 et 1000 µl, 5- Embouts de 200 et 1000 µl, 6- Tubes de 500 µl, 1500µl 7- Plaque chauffante, 8- Vortexeur 9- Marqueurs à bout fin indélébile, 10- Minuterie, 11- Portoirs, 12-Hotte à flux laminaire (Steril-VBH) 13 - Blouses 14- Poubelle. 15-Congélateur	1- Méthanol, 2- Eau stérile,

Amplification	1-Gants, 2-Tubes (0,2ml), 3-Termocycleurs (Eppendorf Mastercycler, PTC-100 Peltier Thermal Cycler) 4-Centrifugeuse, 5-Pipettes et embouts (1000ul, 200ul, 100ul, 20ul et 10ul), 6-Portoirs, 7-Stylos marqueurs; 8-Hotte à flux laminaire (SterilVBH)	1-ADN 2-dNTPs 3-Taq polymérase 4-Primers ou amorces 5-Tampon 10X (10X PCR Buffer II) 6-MgCl ₂ 25 mM 7-Eau stérile
Electrophorèse	1-Muniterie, 2-Erlenmeyer 3-Four à micro-ondes 4-Micropipettes P10, P20 5-Portoirs pour tubes eppendorf 6-Portoirs pour micropipettes 7-Bacs à électrophorèse et peignes 8-Papier para film (sigma p7543) 9-Balance (APX-1502) 10-Générateur de courant électrique 11-Transluminateur à UV (Bioblock scientific) 12- Appareil photo (Fisher Bioblok Scientific RMB92)	1-Bromure d'éthidium (BET) 2-Bleu de bromophénol 3-TAE (sigma, USA) 4-Agarose 5- Marqueur de poids moléculaire 6-Eau distillée

II. Méthode d'étude

II.1. Extraction d'ADN plasmodial par le méthanol

Dans notre travail, l'ADN plasmodial a été extrait par la méthode du méthanol. Pour ce faire, nous avons adopté la démarche suivante:

- Porter des gants stériles

- Numérotter les tubes de 500µl conformément aux numéros des confettis à traiter
- Avant de découper le confetti :
 - toujours nettoyer les ciseaux avec l'eau de javel diluée.
 - Sécher les ciseaux avec du coton.
- Découper approximativement 3mm² du confetti et le placer dans le tube eppendorf correspondant.
- Ajouter 75 µl de méthanol dans chaque tube contenant les morceaux de confettis préalablement découpés de manière à les immerger entièrement.
- Fermer les tubes et laisser incuber pendant 15 minutes à la température ambiante du laboratoire.
- Verser le méthanol contenu dans les tubes sans faire tomber les morceaux de confettis et les sécher complètement sous vide ou à l'air libre.
- Après séchage, ajouter dans chaque tube 50 à 150µl d'eau stérile puis les fermer.
- Mettre 150µl de l'eau utilisée pour l'extraction dans un tube vide sans confettis qui servira de contrôle négatif pour cette eau d'extraction.
- Chauffer les tubes sur plaque pendant 15 minutes entre 95-100°C en les vortexant toutes les 5 minutes.
- Enfin procéder à l'amplification ou stocker les ADN ainsi extraits dans un congélateur à -20°C après les avoir refroidi à la température ambiante.

II.2. Préparation des solutions de dNTPs

Pour les dNTPs, à partir des solutions mères de concentration 100mM, nous avons préparé une solution de travail de dNTP: AT=GC. Pour obtenir un volume final de 200 $\mu\ell$ avec des concentrations initiales de A, T, G et C égales à 25 μmol , nous avons prélevé à l'aide d'une pipette, 4 $\mu\ell$ de A, T, G et C que nous avons mélangé avec 184 $\mu\ell$ d'eau distillée dans un tube eppendorf. La concentration finale de la solution de dNTP est de 2 μmol . Ce mélange est ensuite vortexé légèrement pour homogénéiser. La solution obtenue est utilisée directement ou gardée au congélateur à -20°C.

II.3. PCR

II.3.1. Principe de la PCR

Dans la cellule, la duplication a lieu juste avant la mitose. L'enzyme qui intervient dans cette duplication est l'ADN polymérase. Cette enzyme allonge les chaînes de nucléotides. Après la séparation des deux brins de la molécule d'ADN (on parle de dénaturation), des fragments d'ARN appelés amorces s'apparient (ou s'hybrident) à leur séquence complémentaire au niveau de chaque brin. L'ADN polymérase les allonge par ajout de nucléotides, aboutissant à la formation d'une copie complémentaire de chaque brin d'ADN. On obtient ainsi deux nouvelles molécules identiques à la molécule de départ. Il y a eu polymérisation.

La PCR est basée sur ce même principe mais elle utilise deux amorces qui sont sous forme d'ADN simple brin. Elle comporte trois étapes principales [32].

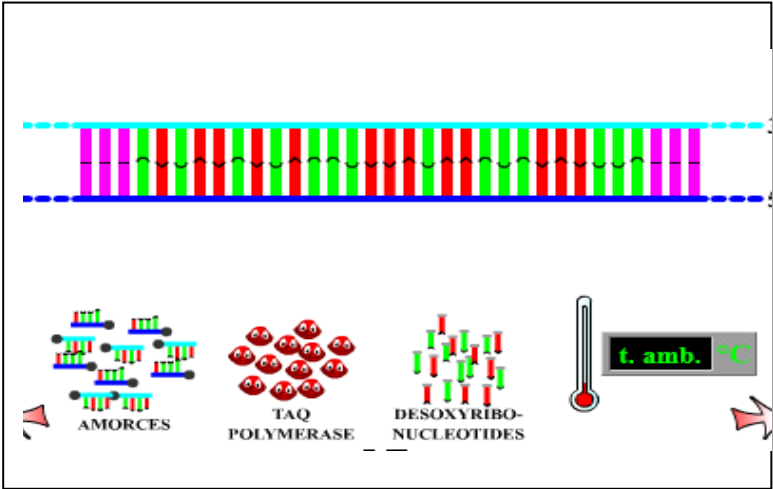
II.3.2. Etapes de la PCR

Dénaturation :

L'ADN est dénaturé par une élévation de la température à une valeur supérieure à la température de fusion (T_m , c'est à dire la température pour laquelle 50% de l'ADN se trouve sous la forme de simple brin). Elle se fait entre 94°C et 97°C pendant environ 15 secondes à 1 minute. En fait, plus la température est élevée, plus le nombre de molécules d'ADN sous forme de simple brin est grand.

Les mauvaises amplifications peuvent résulter d'une dénaturation incomplète. Pour cette raison, une première phase de dénaturation assez longue de 5 min est incluse. Elle ne se répète pas tout au long de l'amplification. Elle permet de s'assurer que tout l'ADN cible se trouve sous la forme de simple brin. Avec des temps de dénaturation très longs, on assiste à une baisse du rendement puisque l'effet de plateau est très vite atteint. L'effet de plateau se traduit par une inactivation d'une grande partie de la Taq polymérase, une raréfaction des nucléotides et des amorces.

ADN CIBLE



1 - DENATURATION

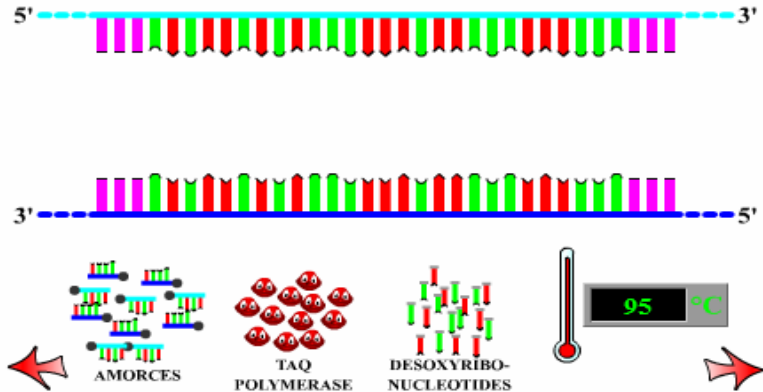


Figure 6: Dénaturation de l'ADN [73]

Hybridation :

Elle a lieu lors du refroidissement jusqu'à une température inférieure de 5°C à la température de fusion des amorces (figure 7). La température d'hybridation varie entre 50 et 72°C et dure moins d'une seconde. Le refroidissement doit se faire le plus rapidement possible afin d'éviter la renaturation de l'ADN cible et de permettre aux amorces qui sont en très fortes concentrations de s'hybrider à leur séquence complémentaire sur l'ADN cible. Une augmentation de la température d'hybridation des amorces, a pour conséquence, d'accroître la spécificité donc de réduire les amplifications parasites.

2 - HYBRIDATION

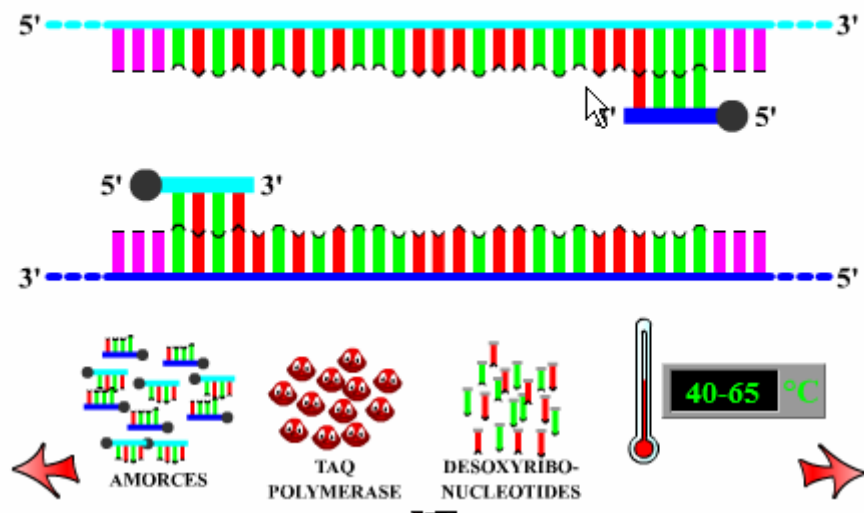


Figure 7: Hybridation de l'ADN [73]

Extension ou élongation :

Chaque amorce fixée sur l'un des deux brins va s'étendre à partir de son extrémité 3' par une juxtaposition de nucléotides sous l'effet de l'ADN polymérase. L'extension des deux amorces se fait en sens opposé en intercalant la séquence à amplifier. Durant cette étape, la température est portée à 72°C. Cette température permet aux ADN polymérases thermostables d'effectuer une synthèse plus rapide.

Lorsque les séquences à amplifier sont longues, il est nécessaire d'allonger le temps d'extension de 1 à 3 minutes. Une phase d'extension plus longue (5 à 10 minutes) a lieu après le dernier cycle. Il permet d'obtenir une meilleure amplification après une raréfaction de substrats (nucléotides et amorces) et une saturation de la Taq polymérase qui a été inactivée pour une grande partie par la chaleur (effet de plateau).

En fait le nombre de nucléotides incorporés dépend non seulement du tampon mais aussi de la concentration en sel et de la concentration en ADN.

Ces trois étapes sont en général répétées 20 à 35 fois selon les quantités d'ADN au départ.

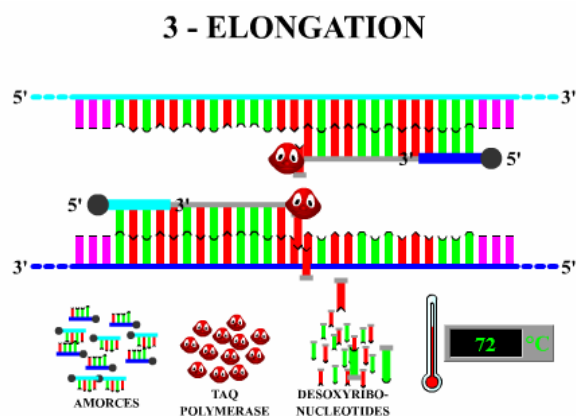


Figure 8: Elongation [73]

Remarque: Il peut y avoir une hybridation des amorces avec d'autres séquences qui ne sont pas ciblées ou un défaut d'hybridation des amorces. De plus, l'extension n'est pas toujours complète. Ce qui fait que le rendement est compris entre 70% et 85%.

II.3.3. Composants de la réaction

ADN :

Il constitue la cible à partir de laquelle se feront les copies. Il doit pour cela être pur, c'est à dire être débarrassé des protéines qui lui sont associées. Ces impuretés peuvent conduire à des amplifications parasites dues aux ARN ou à une baisse du rendement par le fait des protéines associées comme les histones. Les origines de cet ADN peuvent être multiples: sang total, confettis, tissus frais, tissus conservés à l'état sec, tissus secs conservés à -70°C , tissus

conservés dans de l'alcool, dans du Carnoy, etc. [54]. De l'ADN peut être également extrait de tissus préparés à l'hématoxyline et à l'éosine. L'ADN ne doit pas comporter de rupture au niveau des séquences à amplifier.

L'ADN peut être associé à des produits qui sont des inhibiteurs de la Taq polymérase soit lors de son extraction (Phénol) soit lors de sa conservation (EDTA). Des lavages au chloroforme permettent d'éliminer le phénol. Des dilutions de solutions d'ADN permettent de réduire l'effet de ces produits [37].

ADN polymérase:

La plus utilisée est la Taq polymérase. Cette enzyme est extraite d'une archéobactérie, *Thermus aquaticus* qui vit dans les sources thermales entre 80 et 90°C [38]. Son ADN polymérase (la Taq polymérase) est thermostable et supporte la température de dénaturation de l'ADN. Son activité est optimale entre 65 et 72 °C [46], une température relativement élevée à laquelle la spécificité de la duplication est accrue. A cette température la Taq polymérase est capable de juxtaposer 100 nucléotides par seconde et par molécule. Les faibles ainsi que les fortes températures ont pour effet de diminuer l'activité de la Taq polymérase. Le pH influe également sur l'activité de cette enzyme. Les meilleurs sont obtenus pour des valeurs comprises entre pH 8,2 et pH 9,0. Une augmentation ou une diminution du pH par rapport à ces valeurs entraîne une baisse de l'activité de la Taq polymérase.

Les concentrations en enzyme varient généralement entre 1 et 2,5 unités par 100 µl final si les autres paramètres sont à leur valeur optimale. Il est à noter que lorsque les Taq polymérases ont des origines différentes, elles se comportent

différemment. Ce fait très important est à prendre en compte si l'on veut utiliser la technique PCR.

La Taq polymérase présente néanmoins des imperfections. Etant dépourvue d'exonucléases, il n'y aura donc pas de correction des erreurs d'incorporation. Elle fait une erreur toutes les 400 bases. Il existe une ADN polymérase thermostable pourvue d'une activité exonucléasique appelée «vent DNA polymérase» [38, 60, 41]. Certains auteurs préfèrent ajouter la Taq polymérase après le premier cycle de dénaturation pour avoir un rendement maximum. Cela est pratique si le nombre d'échantillons à traiter est petit, si ce n'est pas le cas il est préférable de mélanger la Taq polymérase à la mixture «mix».

Nucléotides (dNTPs) :

Les solutions de travail sont constituées d'un mélange équimolaire des quatre désoxynucléotides : dATP, dTTP, dGTP et dCTP. Ils sont regroupés sous le terme général de dNTPs. Ce type de mélange équimolaire permet d'éviter les erreurs d'incorporation par la Taq polymérase. Les solutions de travail sont divisées en de petits aliquots et gardées à -20°C . La concentration utilisée est de 2mM. Il est préférable d'utiliser les faibles concentrations en nucléotides car elles ont pour effet de minimiser les mauvais appariements des amorces à des sites non ciblés.

Amorces ou «primers» :

Il s'agit de courts fragments d'ADN qui, sont complémentaires à l'ADN cible sous forme de simple brin de 20 à 35 paires de bases chacun [35, 40]. Ces

amorces doivent avoir des quantités de (G + C) et (A + T) sensiblement égales afin d'éviter la formation de structures secondaires comme les boucles [35, 40]. Mais des températures d'hybridation trop élevées diminuent la spécificité. Une des deux amorces ne doit pas être complémentaire de l'autre pour éviter l'hybridation des amorces entre elles [8, 60]. Généralement, la concentration des amorces est de l'ordre de 0.2 mM. A cette concentration, l'hybridation se fait en quelques secondes. Pour éviter de congeler et décongeler très souvent, les solutions de primer sont séparées en de petits aliquots. Les fortes concentrations doivent être évitées car elles entraînent des amplifications de séquences non ciblées.

Tampon :

Il existe toute une variété de tampons. Les tampons sont optimisés en fonction des paramètres de la PCR. Ils se composent en général de Tris-HCl (tris-(hydroxyméthyl) aminométhane), de chlorure de magnésium ($MgCl_2$), de chlorure de potassium (KCl_2), de gélatine et de détergents.

➤ Le tris-HCl (Tris-(hydroxyméthyl) aminométhane)

Il régule le pH de la réaction. Ce pH joue un rôle très important car il intervient au niveau de l'activité de la Taq polymérase. Le pH du tris-HCl décroît de 0,03 unité par degré lorsqu'on augmente la température, permettant ainsi d'obtenir à 72°C la valeur d'activité optimale de la Taq polymérase [35, 40].

➤ Le chlorure de magnésium ($MgCl_2$) :

Il fournit les ions Mg^{2+} qui affectent pratiquement tous les autres paramètres de la réaction: hybridation, dénaturation, spécificité, formation de dimères d'amorces (primers dimers). Ces ions sont nécessaires à l'activité et à la fidélité de la Taq polymérase [7]. Il peut interagir avec les nucléotides, mais aussi avec les chélateurs comme l'EDTA. De ce fait il devient inaccessible à la Taq polymérase qui est alors inhibée, entraînant ainsi une baisse du rendement de la synthèse. Sa concentration (0,2 à 2,5 mM) dans le milieu d'incubation doit être supérieure à celle des nucléotides de quelques millimoles. Les protéines et les acides nucléiques peuvent également fixer le $MgCl_2$, le rendant inaccessible à la Taq polymérase, d'où l'intérêt d'éviter les très fortes concentrations en ADN cible.

➤ Le chlorure de potassium (KCl) :

Les sels ne sont pas indispensables à la réaction. Ils ont une action inhibitrice sur la Taq polymérase. Cependant ils ont un rôle très important car ils facilitent l'hybridation des amorces. Il convient donc d'optimiser la concentration du KCl dans le milieu d'incubation [38, 35, 40].

➤ Les détergents et la gélatine

En solution aqueuse, la Taq polymérase fortement hydrophobe a tendance à précipiter. Pour cette raison, les détergents tels que le Triton X-100, le NP 40 ou le Tween 20 sont parfois ajoutés dans le milieu pour stabiliser la Taq polymérase et lui conférer le maximum d'activité [35, 40]. Les protéines stabilisent également la Taq polymérase ; la gélatine a l'avantage de supporter les températures de dénaturation.

L'eau joue également un rôle important dans la réaction car elle apporte des ions hydrogènes.

III.3.4. Détection et analyse des produits de PCR

Electrophorèse :

C'est la migration de particules chargées sous l'influence d'un champ électrique. Dans un milieu liquide, les acides nucléiques se déplacent à la même vitesse [12] donc ils ne peuvent y être séparés qu'en fonction de leur taille. Les milieux utilisés sont ceux qui freinent les molécules en fonction de leur taille. C'est le cas des gels.

En PCR, les fragments obtenus sont analysés sur des gels d'agarose ou d'acrylamide. Lors de la polymérisation, ces gels définissent des mailles plus ou moins régulières entre lesquelles passent les molécules à des vitesses différentes selon leur taille. Les gels d'acrylamide sont utilisés pour séparer les fragments de petite taille. Les fragments d'ADN plus grands sont analysés sur gel d'agarose. Selon la taille des fragments à séparer, les pourcentages d'agarose ou d'acrylamide sont variables [38].

Tableau 4 : Pourcentage de l'agarose et de l'acrylamide en fonction de la taille des fragments en Kb

Pourcentage d'agarose (%)	Taille des fragments en Kb
0,6 à 0,8	1 à 20
0,9 à 1,2	0,5 à 7
1,2 à 15	0,2 à 5

Pourcentage acrylamide (%)	Taille des fragments en Kb
4	0,2 à 0,8
5	0,08 à 0,2
8	0,04 à 0,1
11	0,01 à 0,05

Révélation des produits de PCR :

Les produits de PCR sont décelés après marquage. Les méthodes de marquage les plus sensibles sont celles qui utilisent soit du bromure d'éthidium (BET), soit du nitrate d'argent (AgNO₃), soit des radio-isotopes.

➤ Marquage au bromure d'éthidium

Le bromure d'éthidium est une molécule qui s'intercale entre les bases de la molécule d'ADN double brin. Il entraîne une fluorescence orange en présence de rayons ultra-violets (UV). Cette fluorescence est plus prononcée dans les

zones où sont concentrées les molécules d'ADN. Le seuil de détectabilité minimum est situé entre 1 et 2ng. Cependant il faut beaucoup d'attention lors de la manipulation du bromure d'éthidium car il est cancérigène. Il est conseillé de toujours porter des masques et des gants pour le manipuler.

➤ Marquage au nitrate d'argent (AgNO_3)

La coloration au nitrate d'argent est plus sensible que celle au bromure d'éthidium. Elle permet de conserver le gel coloré. Elle nécessite cependant plus de temps. Après avoir fixé au méthanol, puis oxydé le gel à l'acide nitrique, il est introduit dans une solution de nitrate d'argent et révélé par la suite.

➤ Marquage aux radio-isotopes

Les nucléotides ou les amorces utilisés dans le « mix » sont marqués par des radio-isotopes (soufre 35 et phosphate 32). La révélation se fera par autoradiographie après avoir séché le gel. Ce dernier est mis ensuite au contact d'un film sensible aux rayonnements émis par les atomes radioactifs. Cet ensemble est enfermé dans une plaque photo en chambre noire pour le mettre à l'abri de la lumière. Un à trois jours après, on révèle le film.

Détermination de la taille des fragments :

Elle se fait par l'introduction d'un marqueur de taille connu (poids moléculaire) que l'on fait migrer en même temps que les échantillons. Le marqueur permet de connaître la taille des différents fragments obtenus après la migration.

II.3.5. Contaminations en PCR

Les premières PCR ont montré très souvent des amplifications au niveau des témoins négatifs (théoriquement dépourvu d'ADN) donnant ainsi naissance à de faux positifs. Ces faux positifs apparaissent très souvent après une longue utilisation des mêmes produits d'incubation qui ont été contaminés au cours du temps par de l'ADN pouvant provenir d'aérosols lors de l'ouverture des tubes, des parois internes des pipettes ayant servi à l'extraction d'ADN ou à la distribution des produits de PCR. Pour minimiser les contaminations, il est conseillé de préparer un « mix » et de réaliser les incubations dans des pièces différentes de celles où sont analysés les produits d'amplification et de celles où est extrait l'ADN. Le travail sous une hotte permet de purifier l'air ambiant du grand nombre d'aérosols contaminants qu'il contient. L'irradiation des lieux par des UV, l'aliquotage en de petits volumes de tous les produits de l'incubation, la distribution de l'ADN en dernier permet de minimiser considérablement les contaminations. Les pipettes et la hotte sont nettoyées avant usage par de l'éthanol à 70°.

II.3.6. Utilisation des enzymes de restriction

On appelle enzyme de restriction des endonucléases spécifiques qui reconnaissent des sites particuliers sur l'ADN et coupent la molécule double brin à ces sites ou à proximité d'eux. Elles sont utilisées pour la recombinaison des molécules d'ADN en vue d'un clonage et pour la détection de mutation génétique par digestion enzymatique.

La détection de mutations génétiques par digestion enzymatique consiste à mettre une molécule d'ADN en présence d'une enzyme de restriction dont le site de reconnaissance comporte un nucléotide potentiellement mutant. L'électrophorèse du mélange sur gel permet de voir le polymorphisme de longueur des fragments et donc de déceler les mutations.

II.4. Electrophorèse

Elle consiste à faire migrer le produit de la PCR sur gel d'agarose contenant du Bromure d'éthidium. La présence ou l'absence de bandes permet de juger l'efficacité de la PCR.

- Préparation du gel d'agarose à 2%
 - Peser 2.5g d'agarose et le mettre dans un becher.
 - Ajouter 150 ml d'une solution de 0.5X TAE (tampon) puis chauffer le mélange au four micro-onde jusqu'à la dissolution complète de l'agarose.
 - Ajouter 5µl de BET dans la solution obtenue et laisser refroidir.
 - Couler le gel dans le bac à électrophorèse horizontal, où l'on a déjà placé des peignes et laisser polymériser.

- Après polymérisation du gel les peignes sont enlevées ce qui laisse des puits,
- Recouvrir le gel refroidi dans le bac avec de la TAE.

➤ Migration

- Sur du papier para film on mélange $3\mu\ell$ d'un poids moléculaire (marqueur de taille de 100pb) avec $2\mu\ell$ de bleu de bromophénol.
- Récupérer le mélange à l'aide d'une pipette et le déposer dans le premier puit.
- Mélanger $10\mu\ell$ de chaque échantillon de la deuxième amplification avec $2\mu\ell$ de bleu de bromophénol
- Récupérer le mélange à l'aide d'une pipette de $20\mu\ell$ puis le déposer successivement dans les puits suivants.
- Faire migrer pendant 30 minutes les échantillons déposés sous un voltage de 100 volts et une intensité de 150 mA.

➤ Révélation

- Récupérer le gel et le mettre sous une lampe UV en utilisant le Spectroline qui émet une lumière ultraviolette.
- Photographier le gel.

➤ Résultats attendus

Ils varient d'un marqueur à l'autre.

II.5. La Polymerase Chain Reaction (PCR)- Restriction Fragment Lince Polymorph (RFLP)

Dans notre travail nous avons procédé par une double PCR appelée «Nested PCR» suivi de la digestion enzymatique pour ce qui concerne les gènes DHPS (codons 437 et 540). Et nous avons opté pour la MSPCR pour ce qui s'agit des gènes DHFR (codons 108, 59 et 51).

II.5.1. La « Nested PCR » pour le gène DHPS

II.5.1.1. Préparation des solutions de dNTPs: Voir II.2.

II.5.1.2. Préparation des solutions d'amorce

Les amorces ou « primers » dont nous disposons ont été commandés au laboratoire Integrated DNA Technologies. Ils sont sous forme lyophilisée : A, B, D1 et D2 de poids respectifs 0,28 mg ; 0,28mg ; 0,25mg et 0,27mg pour ce qui concerne le codon 437. Pour ce qui va s'agir du codon 540 on a les poids suivants 0,20mg ; 0,27mg ; 0,20mg et 0,37mg. Pour le travail nous avons préparé des dilutions à partir de chaque poudre tout en sachant que le volume stock est fixé à 500µl. A partir de ce dernier nous avons déterminé la concentration initiale contenue dans ce volume selon la formule suivante :

$$C = M / V.$$

Tout en sachant que la concentration finale doit être de 10pmol/µl et que le volume final est de 300µl. A partir de ces données nous avons alors déterminé le volume à prélever selon la formule : $C_i V_i = C_f V_f$.

II.5.1.3. Première amplification

Pour réaliser cette première amplification, nous avons utilisé les primers A et B (tableau 5); la démarche adoptée est la suivante:

- Inscrire le numéro d'identification du confetti sur les tubes (0,5 ml ou 0,2 ml)
- Préparer le Master MIX dans un tube de 1,5ml en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction selon le tableau 5
- Repartir dans chaque tube identifié 20 μ l de Master MIX
- Ajouter 5 μ l d'ADN extrait au méthanol dans chaque tube correspondant
- Centrifuger brièvement les tubes
- Placer les tubes bien fermés dans le thermocycleur pour l'amplification avec le programme approprié (Tableau 5).
- Mettre en marche le thermocycleur.
- Faire l'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% avant de passer à la deuxième amplification.

II.5.1.4. Deuxième amplification

Pour réaliser la deuxième amplification nous avons utilisé les primers D1 et D2 (tableau 5); la démarche adoptée est la suivante:

- Inscrire le numéro d'identification des tubes de la première amplification sur de nouveaux tubes (0,5ml ou 0,2ml)
- Préparer le Master MIX dans un tube de 1,5ml en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction selon le tableau 5
- Repartir dans chaque tube identifié 24 μ l de Master MIX

- Ajouter 1µl du produit de la première amplification dans chaque tube correspondant
- Centrifuger brièvement les tubes avant de les mettre dans la machine
- Placer les tubes bien fermés dans le thermocycleur pour l'amplification avec le programme approprié (Tableau 5).
- Mettre en marche le thermocycleur.
- Faire l'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% pendant 20 à 30 minutes.
- Faire la photo du gel

Tableau 5 : Protocole de la PCR

Première amplification			Deuxième amplification		
<i>Amorces</i>			<i>Amorces</i>		
400-A : GGGGTATTAAATGTTAATTATGATTCT			400-D1 : TGTTCAAAGAATGTTTGAAATGA		
400-B : GGGGTCACATTTAACAATTTTATT			400-D2 : CCATTCTTTTTGAAATAATTGTAAT		
500-A : GGGCCCAAACAAATTCTATAGTG			500-D1 : GCGCGCGTTCTAATGCATAAAAAGAGG		
500-B : GGCCGGTGGATACTCATCATATA			500-D2 : CGGGTAAGAGTTTAATAGATTGATCAGCTTTC TTC		
<i>Mélange réactionnel</i>			<i>Mélange réactionnel</i>		
Réactifs	Concentrations	Volume (µl)	Réactifs	Concentrations	Volume (µl)
Buffer	1X	3	Buffer	1X	3
MgCl ₂	2,5mM	2	MgCl ₂	2,5mM	2
dNTP	200uM	2,5	dNTP	200uM	2,5
Primer A	1uM	0,125	Primer D1	1uM	0,125
Primer B	1uM	0,125	Primer D2	1uM	0,125
Tap poly	0,025u	0,125	Tap poly	0,025u	0,125
H ₂ O	✓	12,125	H ₂ O	✓	16,125
ADN extrait	✓	5	ADN extrait	✓	1
Total		25	Total		25

PROGRAMME

Etapes	Température	Temps
Dénaturation initiale	95°C	5 minutes
Dénaturation	92°C	30 secondes
Hybridation	45°C	30 secondes
Extension	65°C	45 secondes
Retour à l'étape 2, 44 fois		
Extension finale	72°C	15 minutes
Fin de programme	4°C	Infini

II.5.1.5. Electrophorèse

Pour le gène DHPS amplifié, la taille des bandes attendues est de 201pb pour le codon 540 et de 150pb pour le codon 437.

II.5.1.6. Digestion enzymatique des codons 437 et 540 du gène DHPS

➤ Les enzymes de restriction

Ce sont des endonucléases spécifiques qui reconnaissent des sites particuliers sur l'ADN et coupent la molécule double brin à ces sites ou à proximité d'eux. Dans notre travail, les enzymes de restriction utilisées sont : Ava II et Fok I.

➤ Protocole de la digestion

Pour réaliser la digestion des codons 437 et 540 du gène DHPS, la méthode utilisée est la suivante:

- Sélectionner les échantillons ayant donnés des bandes
- Inscire le numéro d'identification des tubes de la deuxième amplification sur de nouveaux tubes.
- Préparer le Master MIX de la digestion dans un tube de 1,5 ml en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction selon le tableau 6.
- Repartir dans chaque tube identifié 15µl de Master MIX de digestion
- Ajouter 5µl du produit de la deuxième amplification dans chaque tube correspondant
- Homogénéiser légèrement le mélange contenu dans les tubes
- Placer les tubes bien fermés dans un bain marie. La digestion se fait à la température de 37°C pendant 6 heures au minimum (Over night).
- Récupérer les tubes et faire l'électrophorèse du produit sur un gel d'agarose à 2% pendant 20 à 30 minutes.
- Faire la photo du gel

➤ Interprétation des résultats de la digestion

Une bonne réaction se traduit par la présence de bandes conformes à celles attendues. Il faut observer la conformité de la taille du produit attendu ainsi que celle des témoins positifs.

Il ne doit pas y avoir de bandes au niveau des témoins négatifs.

Pour le codon 437, l'enzyme Ava II coupe la souche mutante en deux bandes de 75pb chacune.

Pour le codon 540, l'enzyme Fok I coupe la souche mutante en deux bandes de 145pb et de 56pb.

Les bandes apparaissent à la fois au niveau des deux témoins correspondent aux souches mixtes.

Tableau 6 : MIX pour la digestion des codons 437 et 540

Réactifs Codons	Tampon (volume en $\mu\ell$)	Enzyme (volume en $\mu\ell$)	Eau (volume $\mu\ell$)
437	NEB1 (2)	Ava II (0,25)	12,75
540	NEB2 (2)	Fok I (0,25)	12,75

II.5.2. La MS-PCR (PCR de mutations spécifiques) pour le gène DHFR

II.5.2.1. Préparation des solutions de dNTPs :

Voir II.2.

II.5.2.2. Préparation des solutions d'amorce ou « primer »

Les primers dont nous disposons viennent du même laboratoire que les précédents. Ils sont aussi sous forme lyophilisée AMP1 et AMP2 pour ce qui concerne la première amplification, de poids respectifs 0,23mg chacun. Pour ce qui va s'agir de la deuxième amplification on a les poids suivants :

Tableau 7 : Poids des primers 108, 59 et 51

Primers	FR-51WB1	FR-51MB1	MUM	FR-59W	FR-M	SP1	DIA-3	DIA-12	SP1A
Poids (mg)	0.23	0.23	0.28	0.16	0.15	0.21	0.11	0.18	0.18

Pour le travail nous avons préparé des dilutions à partir de chaque poudre tout en sachant que le volume stock est fixé à 500µl. A partir de ce dernier on va déterminer la concentration initiale contenu dans ce volume selon la formule suivante : $C = M / V$.

Tout en sachant que la concentration finale doit être de 10pmol/µl et que le volume final est de 300µl. A partir de ces données nous allons alors déterminer le volume à prélever selon la formule : $C_i V_i = C_f V_f$.

Amorce :

Première amplification

AMP1 : TTTATATTTTCTCCTTTTAA

AMP2 : CATTTTATTATTCGTTTTCT

Deuxième amplification

Amorces pour le codon 51

FR-51WB1 du codon sauvage (AAT = Asn) :

GGAGTATTACCATGGAAATGTCA

FR-51MB1 du codon mutant (ATT=Ile) :

GGAGTATTACCATGGAAATGTCT

Amorce complémentaire

MUM-D : TTTATCCTATTGCTTAAAGGTTTA

Amorces pour le codon 59

FR59W du codon sauvage (TGT = Cys) : ATGTTGTA ACTGCACA

FR59M du codon mutant (CGT = Arg) : ATGTTGTA ACTGCACG

Amorce complémentaire au codon 59

SP1 : ATGATGGAACAAGTCTGCGAC

Amorces pour le codon 108

DIA-3 du codon sauvage (AGC = Ser) : GAATGCTTTCCCAGC

DIA-12 du codon mutant (AAC = Asn) : GGAATGCTTTCCCAGT

Amorce complémentaire pour le codon 108,

SP1 : ATGATGGAACAAGTCTGCGAC

III.5.2.3. Première amplification

Pour réaliser cette première amplification nous avons utilisé les primers AMP1 et AMP2. On procède selon le protocole suivant :

- Inscrire le numéro d'identification du confetti sur les tubes (0,5 ml ou 0,2 ml)
- Préparer le Master MIX dans un tube de 1,5ml en fonction du nombre d'échantillon à traiter par réaction selon le tableau 8
- Repartir dans chaque tube identifié 20µl de Master MIX
- Ajouter 5µl d'ADN extrait au méthanol dans chaque tube correspondant
- Centrifuger brièvement les tubes

- Placer les tubes bien fermés dans le thermocycleur pour l'amplification avec le programme approprié (Tableau 9).
- Faire l'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% avant de passer à la deuxième amplification.
- Faire la photo du gel
- Interpréter la photo (présence ou non de bande).

Tableau 8 : Composition du Master MIX pour la première amplification

Composant	Concentration finale	Volume par réaction en μ l
H ₂ O	√	12.125
5X buffer 12.5 Mg	1X (2.5mM Mg ⁺⁺)	5
10X dNTPs	1X (200uM)	2,5
100X Amorces (Amp1+Amp2)	1X (1uM)	0,25
Taq Polymerase (5U/ul)	0,025 u	0,125
TOTAL	√	20

Tableau 9 : Programme de la première amplification commun aux codons 51, 59 et 108

	Etapes	Températures	Temps
1	Dénaturation initiale	95°C	5 min
2	Dénaturation	92°C	30 secs
3	Hybridation	45°C	30 secs
4	Extension	65°C	45 secs
5	Retourner à l'étape 2, 44 fois		
6	Extension finale	72°C	15 min
7	Fin du programme	4°C	Infini

II.5.2.4. Deuxième amplification

Cette deuxième amplification va se faire avec les primers suivants : FR-51WB1, FR-51MB1 et MUM pour le codon 51 ; FR-59W, FR-59M et SP1 pour le codon 59 ; DIA-3, DIA-12 et SP1 pour le codon 108 selon le schéma suivant :

- Pour chaque échantillon de la première amplification, identifier deux tubes correspondant aux couples d'amorces sauvage et mutant
- Préparer un Master MIX pour chaque couple d'amorces en fonction du nombre d'échantillons à traiter selon le tableau 10
- Repartir dans chaque tube 24µl de Master MIX;
- Ajouter un volume du produit de la 1^{ère} amplification dans chaque tube correspondant en fonction de la présence (0,1ul) ou non (1ul) de bande
- Centrifuger brièvement les tubes
- Placer les tubes bien fermés dans le thermocycleur pour la 2^e amplification suivant le programme approprié (Tableau 11 ; 12 et 13).
- Faire l'électrophorèse sur gel d'agarose à 2%.
- Faire la photo du gel
- Interpréter la photo

Tableau 10 : Composition des deux Master MIX pour la deuxième amplification

Composants	Concentrations finales	Volume par réaction en µl
H2O	√	17,025
5X buffer 12.5 Mg ⁺⁺	1X (2.5mM de Mg ⁺⁺)	5
10X dNTPs	1X (200uM)	2,5
100X Amorces (C+w)* et(C+M) **	1X (1uM)	0,25
Taq Polymerase (5U/ul)	0,025 u	0,125
TOTAL***	√	24,9

* *Correspond à l'amorce Wild et son complémentaire*

** *Correspond à l'amorce Mutant et son complémentaire*

*** *Pour un volume total de 25ul, ajouter 0,1ul du produit de la première amplification*

Tableau 11 : Programme de la deuxième amplification du codon 51

	Etapes	Température	Temps
1	Dénaturation initiale	95°C	3 min
2	Dénaturation	92°C	30 secs
3	Hybridation	54°C	45 secs
4	Extension	72°C	1 min
5	Retourner à l'étape 2, 15 - 20 fois		
6	Extension finale	72°C	3 min
7	Fin du programme	4°C	Infini

Tableau 12 : Programme de la deuxième amplification du codon 59

	Etapes	Température	Temps
1	Dénaturation initiale	95°C	3 min
2	Dénaturation	92°C	30 secs
3	Hybridation	54°C	30 secs
4	Extension	72°C	30 secs
5	Retourner à l'étape 2, 15 - 20 fois		
6	Extension finale	72°C	3 min
7	Fin du programme	4°C	Infini

Tableau 13 : Programme de la deuxième amplification du codon 108

	Etapes	Température	Temps
1	Dénaturation initiale	95°C	3 min
2	Dénaturation	92°C	30 secs
3	Hybridation	55°C	45 secs
4	Extension	72°C	45 secs
5	Retourner à l'étape 2, 15 - 20 fois		
6	Extension finale	72°C	3 min
7	Fin du programme	4°C	Infini

II.5.2.5. Electrophorèse

L'interprétation de la photographie du gel tient compte des conditions suivantes :

1. Conformité de la taille du produit de la deuxième amplification par rapport à celle attendue :

Taille du produit de la deuxième amplification: 238pb (pour le dhfr51)

Taille du produit de la deuxième amplification : 190pb (pour le dhfr59)

Taille du produit de la deuxième amplification : 337pb (pour le dhfr108)

2. L'absence de bandes au niveau des contrôles négatifs.

Un échantillon est considéré sauvage ou mutant lorsqu'une bande apparaît avec le couple d'amorces correspondant. En revanche le caractère mixte est évoqué devant un échantillon présentant deux bandes avec les couples d'amorces correspondant.

On ne procède pas à une digestion pour ce qui s'agit de la MS-PCR.

Chapitre II : Résultats

I. Caractéristiques de la population étudiée

En janvier 2007, 1858 prélèvements ont été faits dans les districts test de Kédougou, Vélingara et Saraya ainsi que dans le district témoin de Tambacounda. Avec respectivement 558 prélèvements pour Kédougou et Saraya, 641 prélèvements pour Vélingara et 659 prélèvements pour Tambacounda.

Parmi ces 1858 prélèvements, 220 échantillons se sont révélés positifs après lecture des lames au microscope.

Ce sont ces 220 prélèvements qui ont été analysés, dans le but de mesurer la prévalence des marqueurs DHFR et DHPS dans la résistance de *Plasmodium falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine.

I.1. Résultats parasitologiques

Les Densités parasitaires sont déterminées de la manière suivante :

$DP = \text{nombre de parasites}/200 \text{ leucocytes} \times 8000$

8000 représente la moyenne de globules blancs chez une personne normale.

La densité parasitaire est exprimée en nombre de parasite / μl .

A Kédougou, la parasitémie moyenne est de 7181p/ μl avec un maximum de 201043p/ μl et un minimum de 96p/ μl .

Au niveau de Saraya nous avons une moyenne de 3118,6p/ μl avec des valeurs extrêmes comprises entre 15451p/ μl et 128p/ μl .

Pour le district sanitaire de Vélingara la moyenne se situe autour de 1206,96p/ μl avec un maxima à 63492p/ μl et un minima à 32p/ μl .

Enfin au niveau de Tambacounda la moyenne est de 3436,12p/μl avec pour valeurs extrêmes 99902p/μl et 48p/μl.

Tableau 14 : Répartition des échantillons et de la DP en fonction du site

District	Kédougou	Saraya	Vélingara	Tambacounda	Total
Nombre de patients	41	10	84	28	163
Pourcentage (%)	25	6	52	17	100
DP moyenne(p/μl)	7181,00	3118,6	1206,97	3436,13	√

I.2. Répartition des patients selon le sexe

De nos 220 échantillons de départ, nous avons au niveau de Kédougou inclus Saraya 36 (soit 52%) nourrissons de sexe masculin soit, un sexe ratio de 1,08.

Au niveau du district sanitaire de Vélingara on dénombre 57 (soit 50%) nourrissons de sexe masculin soit, un sexe ratio de 1.

Pour ce qui va s'agir de Tambacounda le nombre d'enfant de sexe masculin est de 20 (soit 56%), soit un sexe ratio de 1,27.

Au total, sur nos 220 patients, la proportion de nourrissons de sexe féminin représente 49% de l'effectif total et celle représentée par le sexe opposé est de 51%.

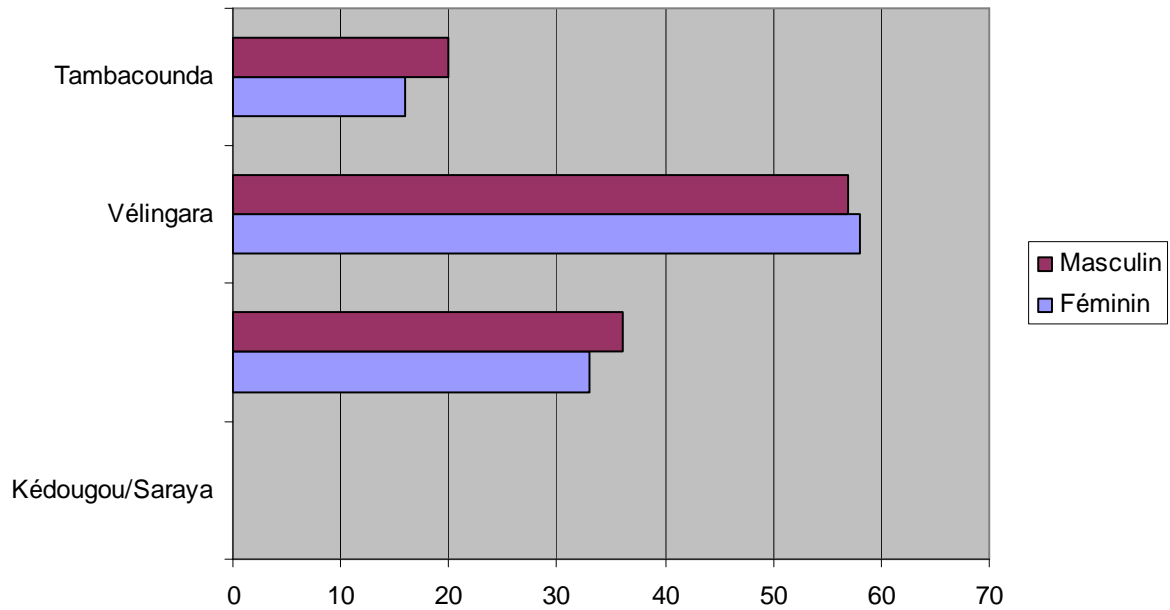


Figure 9 : Répartition des patients en fonction du site et du sexe

I.3. Répartition des patients selon le site

Nous disposons au départ de 220 prélèvements qui, sont réparties de la façon suivante : 60 (27%) pour le district sanitaire de Kédougou, 14 (6%) pour le district sanitaire de Saraya. Pour celui de Vélingara nous avons un effectif de 112 (51%) et enfin 34 (16%) pour le district de Tambacounda.

Tableau 15 : Répartition des échantillons en fonction du site d'étude

District	Kédougou	Saraya	Vélingara	Tambacounda	Total
Nombre de patients	60	14	112	34	220
Pourcentage	27%	6%	51%	16%	100%

Cependant seuls 163 échantillons ont donnés des résultats après l'analyse par la PCR, aussi bien pour le gène DHPS que pour celui du DHFR : les autres

échantillons présentent une faible parasitémie ce qui explique l'absence de résultats à leur niveau.

Nous avons après analyse la répartition suivante : 41 pour le district sanitaire de Kédougou soit 25%, 10 pour Saraya soit 6%, 84 pour Vélingara soit 52% et enfin 28 soit 17% pour Tambacounda.

II. Efficacité de l'amplification des gènes DHFR et DHPS

Nous constatons que sur les 163 échantillons analysés dans les 4 districts sanitaires, 25 soit 15% de ces échantillons portent le gène sauvage tandis que 138 soit 85% présentent au moins une mutation.

Le district sanitaire de Vélingara présente un nombre plus élevé de mutations (71 soit 51%) et de sauvages (13 soit 52%) par rapport aux autres districts.

On retrouve 94 échantillons portant la mutation 108, 67 portant la mutation 59 et 37 portant la mutation 51.

Le gène DHPS présente 72 échantillons mutés pour le codon 437 contre 6 pour le codon 540.

Tableau 16 : Proportion d'échantillons mutés en fonction du site

District	Effectifs analysés	% des sauvages	% des mutés
Kédougou	41	9 (36%)	32 (24%)
Saraya	10	0 (0%)	10 (7%)
Vélingara	84	13 (52%)	71 (51%)
Tambacounda	28	3 (12%)	25 (18%)
Total	163	25	138

II.1. Efficacité de l'amplification du gène DHFR

II.1.1. Efficacité de l'amplification du codon 108

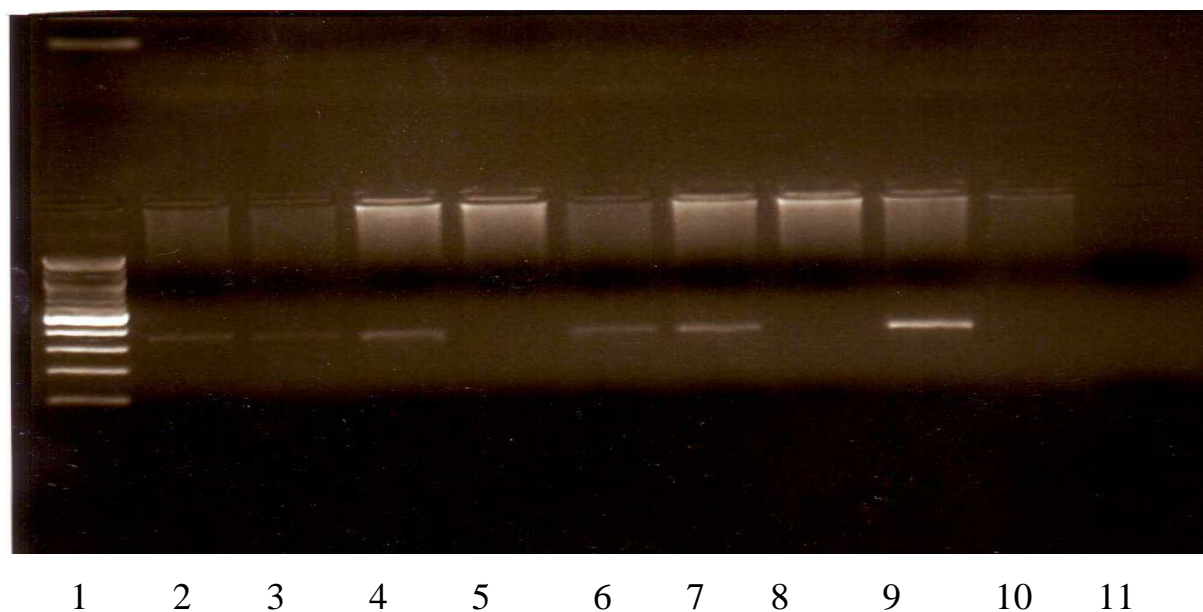


Photo 1 : Résultats de la migration du codon 108

Le puit n°1 correspond au poids moléculaire qui permet d'indiquer la taille des bandes. Les puits n°2, 3, 4, 6, 7, et 9 présentent une bande comprise entre 300 et 400pb chacun, ce qui veut dire qu'on est en présence d'une mutation.

Les puits n°5, 8 et 10 ne présentent pas de bandes donc, se sont des échantillons qui n'ont pas de mutations.

Le puit n°11 correspond au témoin négatif donc pas de bande.

Au niveau du codon 108, le district sanitaire de Vélingara comporte le plus de mutations soit 31% des échantillons analysés.

Tableau 17: Distribution des mutations pour le codon 108

Districts	Kédougou	Saraya	Vélingara	Tambacounda	Total
Nombre de mutations	20(12%)	5(3%)	50(31%)	19(12%)	94(58%)

II.1.2. Efficacité de l'amplification du codon 59

Le nombre le plus élevé de mutations pour le codon 59 se trouve au niveau du district sanitaire de Vélingara (40 soit 25%).

Tableau 18: Distribution des mutations du codon 59

Districts	Kédougou	Saraya	Vélingara	Tambacounda	Total
Nombre de mutations	14(9%)	4(2%)	40(25%)	9(5%)	67(41%)

II.1.3. Efficacité de l'amplification du codon 51

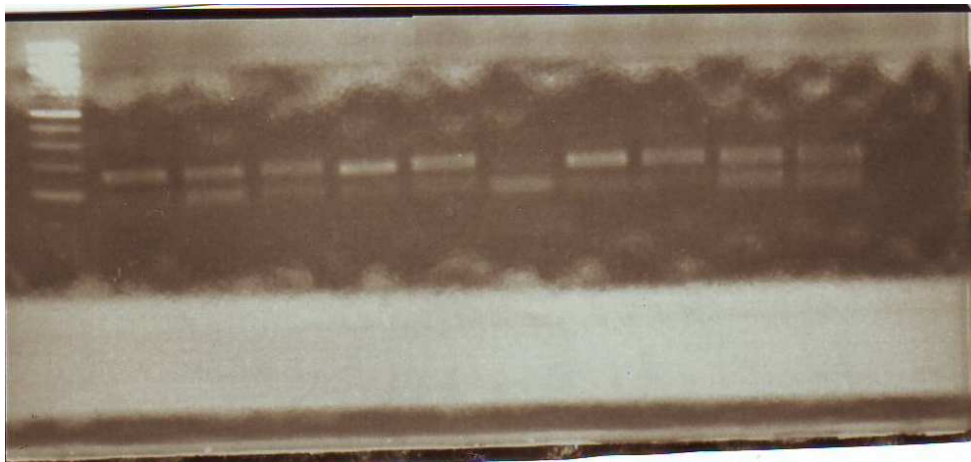
Encore une fois le district sanitaire de Vélingara est le site qui a le plus de mutations. Pour le codon 51 ses mutations sont de l'ordre de 19 soit, 12% de l'effectif total.

Tableau 19: Distribution des mutations du codon 51

Districts	Kédougou	Saraya	Vélingara	Tambacounda	Total
Nombre de mutations	10(6%)	2(1%)	19(12%)	6(4%)	37(23%)

II.2. Efficacité de l'amplification du gène DHPS

II.2.1. Efficacité de l'amplification du codon 437



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Photo 2 : Résultats de la migration du codon 437

Le premier puit représente le poids moléculaire.

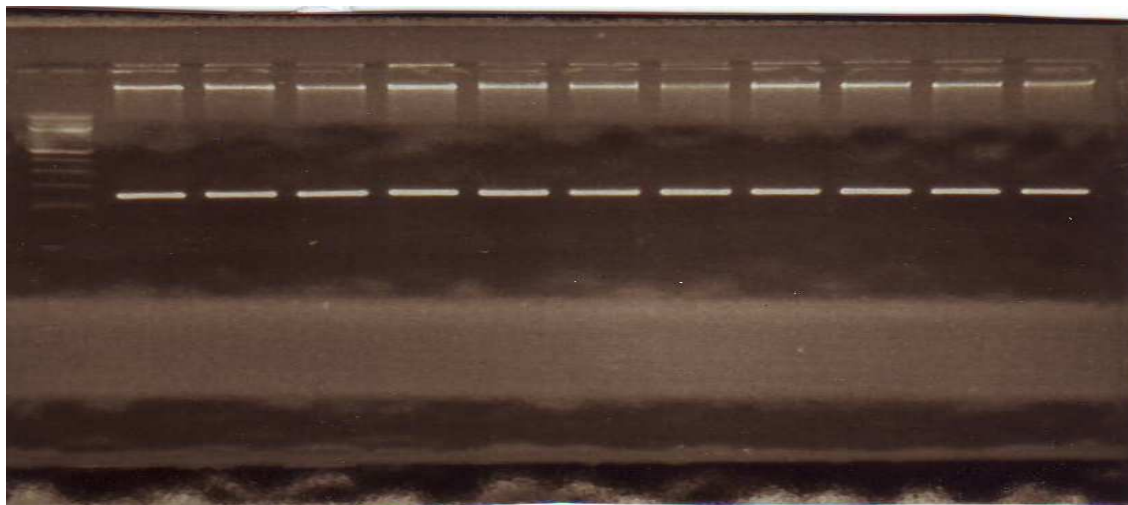
Tous les autres puits (2 au 11) présente une double bande qui caractérise la présence de mutation (une seule bande indique la présence de gène sauvage).

Le district de Vélingara présente encore une fois le plus grand nombre de mutations, 37 soit 23%.

Tableau 20: Distribution des mutations pour le codon 437

Districts	Kédougou	Saraya	Vélingara	Tambacounda	Total
Nombre de mutations	15(9%)	10(6%)	37(23%)	10(6%)	72(44%)

II.2.2. Efficacité de l'amplification du codon 540



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Photo 3 : Résultats de la migration du codon 540

Le puit n°1 représente le poids moléculaire.

Tous les autres puits ne renferment qu'une seule bande donc, pas de mutations.

Avec 4% de mutations, Tambacounda est le seul site qui présente des mutations.

Tableau 21: Distribution des mutations du codon 540

Districts	Kédougou	Saraya	Vélingara	Tambacounda	Total
Nombre de mutations	0(0%)	0(0%)	0(0%)	6(4%)	6(4%)

Tableau 22: Distribution des mutations en fonction des sites

Codon	Kédougou	Saraya	Vélingara	Tambacounda	Total %
51	10 (6%)	2 (1%)	19 (12%)	6 (4%)	37 (23%)
59	14 (9%)	4 (2%)	40 (25%)	9 (5%)	67 (41%)
108	20 (12%)	5 (3%)	50 (31%)	19 (12%)	94 (58%)
437	15 (9%)	10 (6%)	37 (23%)	10 (6%)	72 (44%)
540	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (4%)	6 (4%)
Sauvages	9 (5%)	0 (0%)	13 (8%)	3 (2%)	25 15%)

III. Haplotypes des mutations des gènes DHFR et DHPS

Le tableau suivant montre que 7(soit 4%) des échantillons analysés présentent la quadruple mutation, 45 (soit 28%) présentent la triple mutation, 27 (soit 17%) la double mutation et enfin 59(soit 36%) la simple mutation.

Tableau 23 : Combinaison des mutations des gènes DHFR et DHPS pour tous les échantillons

	Quadriple	Triple	Double	Simple	Sauvage	Total
Effectifs	7	45	27	59	25	163
Pourcentage%	4%	28%	17%	36%	15%	100%

III.1. Combinaison des mutations des gènes DHFR et DHPS en fonction du codon et du site

La quadriple mutation est présente au niveau de 7 souches soit 4% des souches analysées et 5% des souches mutées. Parmi ces 7 souches, 2 (soit 29%) se retrouvent au niveau du site de Kédougou, 1 (soit 14%) au niveau du site de Saraya, 3 (43%) au niveau de celui de Vélingara et 1 (soit 14%) au niveau de celui de Tambacounda.

La triple mutation elle, est présente sur 45 souches soit 28% des échantillons analysés et 32% de ceux qui ont subi une mutation.

Il s'agit donc de : 9 (20%) à Kédougou, 3 (7%) à Saraya, 26 (58%) à Vélingara et 7 (15%) à Tambacounda.

La double mutation est présente au niveau de 27 souches, soit 17% des échantillons analysés et 20% des échantillons mutés. Parmi ces 27 souches nous avons : 3 (11%) à Kédougou, 2 (7%) à Saraya, 14 (52%) à Vélingara et 8 (30%) à Tambacounda.

La simple mutation est présente pour 59 souches soit 36% des échantillons analysés et 43% des souches mutées. La répartition est la suivante : 18 (31%) à Kédougou, 4 (7%) à Saraya, 28 (47%) à Vélingara et 9 (15%) à Tambacounda.

Tableau 24 : Combinaison des mutations en fonction du site

District	Kédougou	Saraya	Vélingara	Tambacounda	Total
Quadriple mutation	2	1	3	1	7
Triple mutation	9	3	26	7	45
Double mutation	3	2	14	8	27
Simple mutation	18	4	28	9	59
Total	32	10	71	25	138

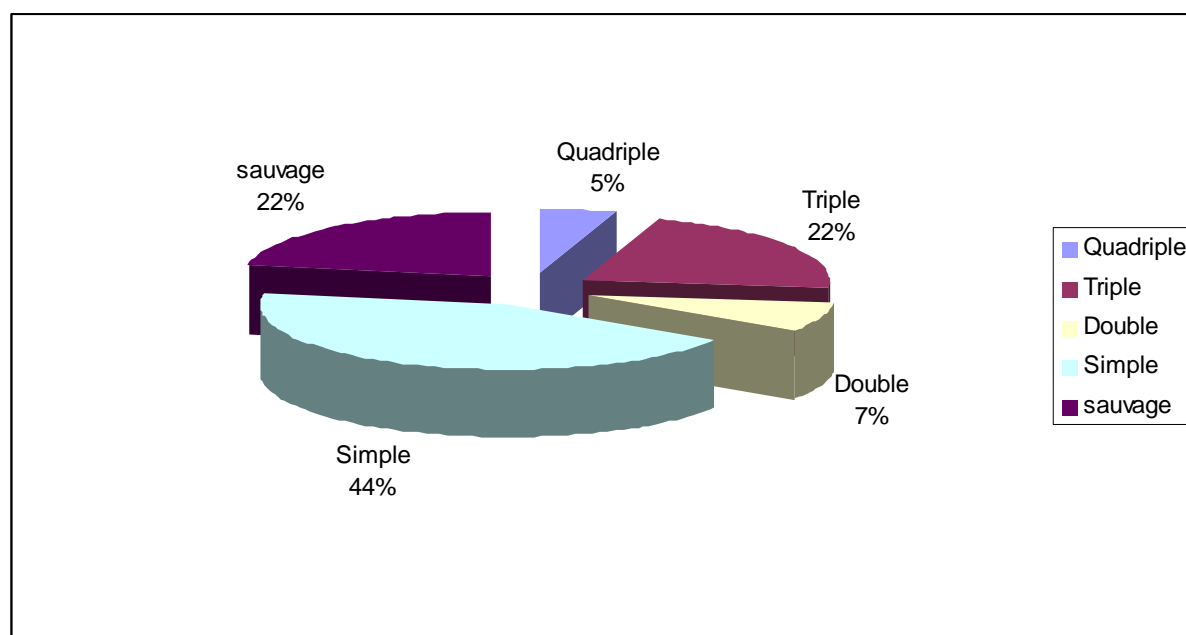


Figure 10: Combinaison des mutations au niveau de Kédougou

La simple mutation est la plus importante au niveau de Kédougou.

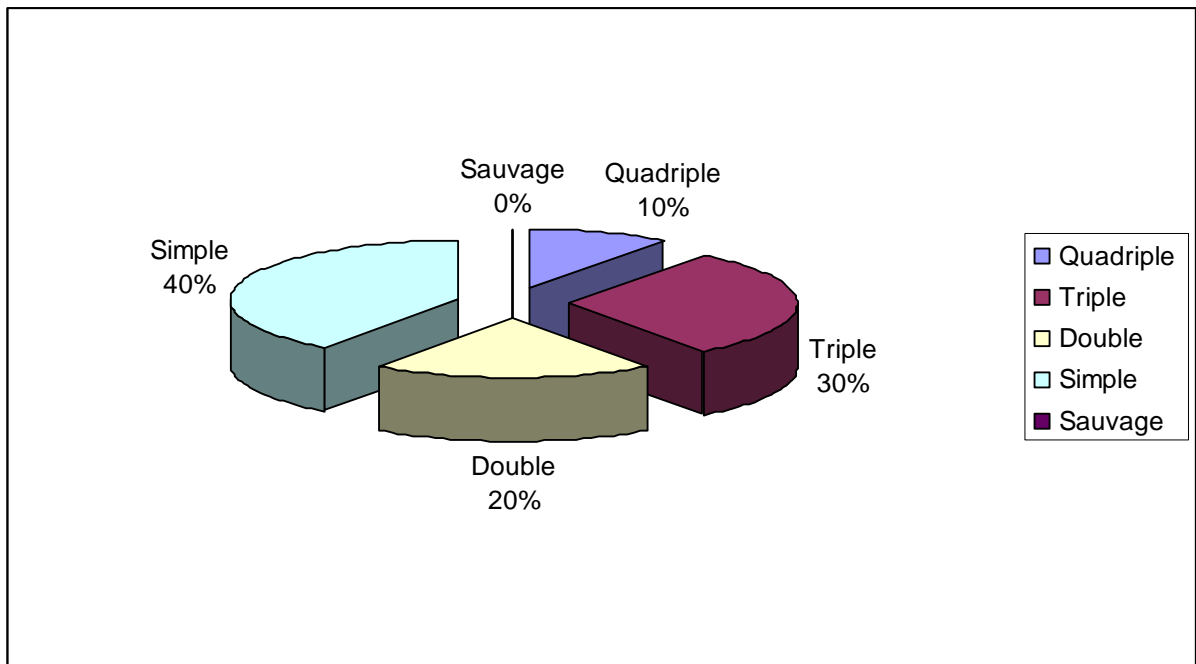


Figure 11: Combinaison des mutations au niveau de Saraya

Nous constatons qu'il n'y a pas d'échantillons sauvages et que la simple mutation est la plus importante.

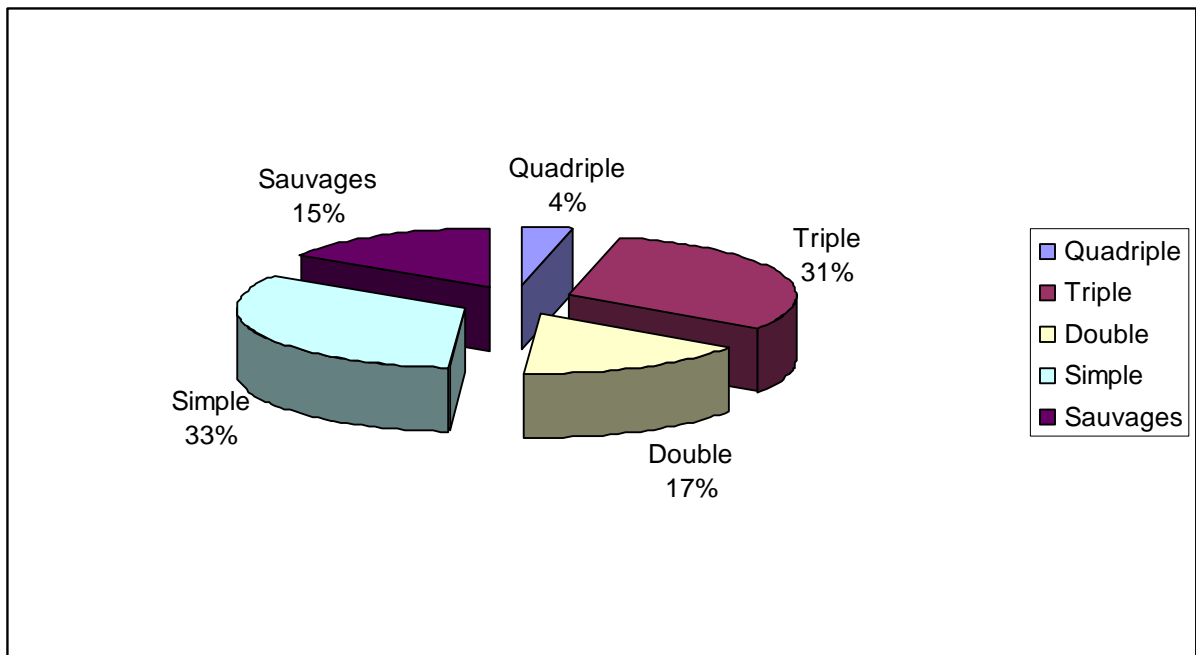


Figure 12: Combinaison des mutations au niveau de Vélingara

La simple mutation est encore la plus représentative.

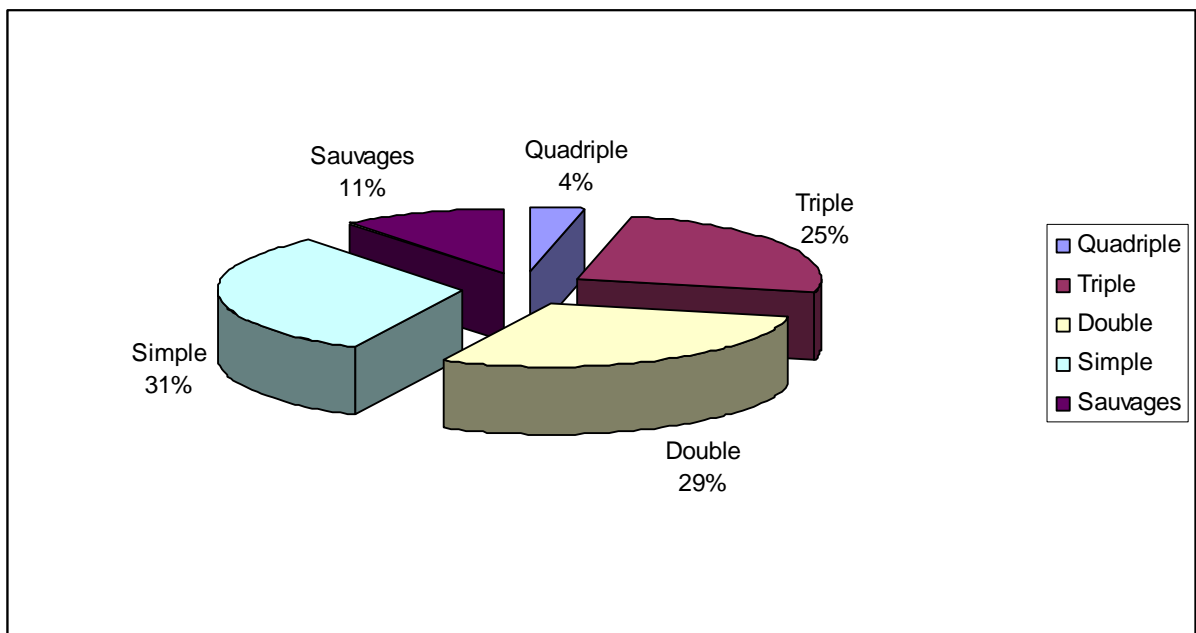


Figure 13: Combinaison des mutations au niveau de Tambacounda

La simple mutation et la double sont les plus représentatifs.

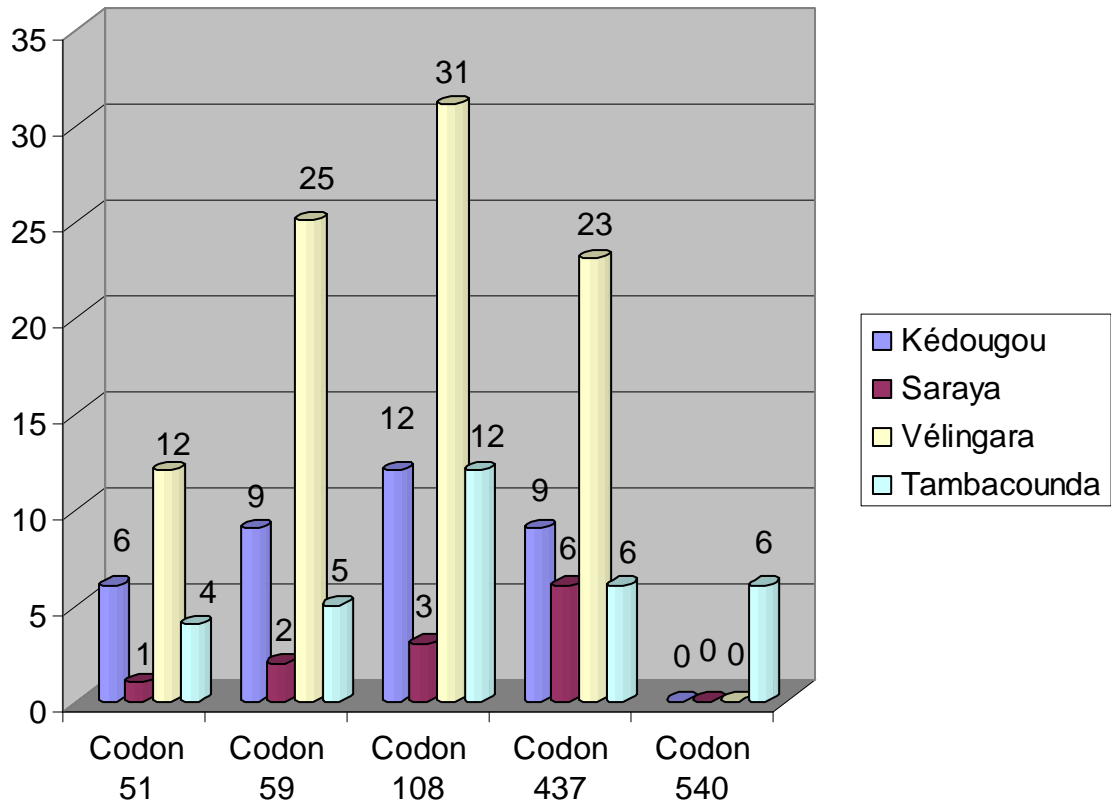


Figure 14 : Histogramme de la prévalence des mutations en fonction du site et des codons en pourcentage

Le district sanitaire de Vélingara est celui qui présente le nombre le plus élevé de mutations pour les codons 51, 59, 108 et 437.

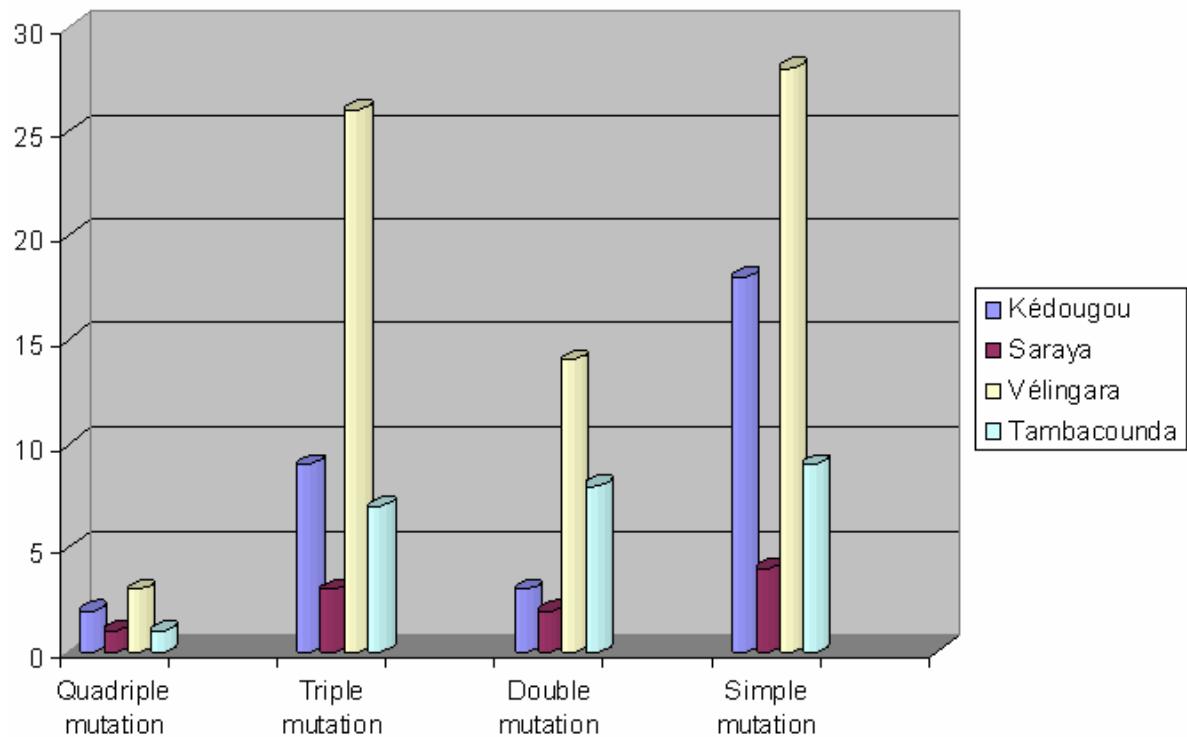


Figure 15 : Histogramme montrant la combinaison des mutations des gènes DHFR et DHPS

Le district de Vélingara comporte le plus grand nombre de combinaisons de mutations.

Chapitre III : Discussion

Notre travail a consisté en la détermination de la prévalence des marqueurs génétiques de la résistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine (SP). En effet l'UNICEF en partenariat avec le Service de Parasitologie de la Faculté de Médecine de Dakar a mis en place une stratégie basée sur la prévention du paludisme chez les enfants de moins de cinq.

Cette étude pilote utilise la sulfadoxine-pyriméthamine et est appelée Traitement Préventif Intermittent chez le nourrisson (TPI-n). La morbidité de la zone est de 8.44.

Des prélèvements ont été effectués au mois de janvier 2007 et, ont contribué à la confection de gouttes épaisses, de frottis sanguins et de confettis.

Ces derniers ont été ensuite acheminés au laboratoire de Parasitologie où ils ont été lus et exploités. Les confettis dont les lames se sont révélées positives ont été analysés par la PCR.

L'étude a été faite par la méthode d'extraction amplification d'ADN dans le but d'analyser le polymorphisme des gènes DHPS et DHFR.

Pour atteindre les objectifs fixés nous avons utilisé la double-PCR pour les produits d'extraction du gène DHPS suivi de la digestion enzymatique.

La MS-PCR a elle été mise à contribution pour les produits d'extraction du gène DHFR.

L'étude a porté sur 220 patients qui ont été prélevés en 2007 pendant la période de transmission intense du paludisme.

Le choix des sites était justifié par leur différence d'endémicité, de niveau de chloroquinorésistance *in vivo* des souches de *Plasmodium falciparum*,

l'adhésion des populations à des études antérieures et l'existence de centre de santé permettant la collecte des données.

L'extraction de l'ADN a été effectuée au méthanol. Cette méthode est moins coûteuse et présente moins de risques pour le manipulateur. L'analyse moléculaire a été effectuée sur les prélèvements.

Elle a constitué en une recherche de mutation au niveau des codons 51, 59, 108 du gène DHFR et des codons 437, 540 du gène DHPS après digestion par une enzyme de restriction du produit PCR, pour chacun des 220 échantillons. Les 57 échantillons analysés n'ayant pas donné de résultats se sont révélés de faible parasitémie.

Nous notons qu'avec la double-PCR le temps de travail est plus long que celui nécessaire à une MS-PCR. Ceci, à cause de la digestion enzymatique qui doit au moins durée 6h sinon au mieux « over-night » (toute la nuit).

Cependant la double-PCR permet d'augmenter la quantité d'ADN pour les échantillons de parasitémie faible.

La MS-PCR quand à elle, joue sur la spécificité et elle est moins longue que la précédente. En effet on a des primers spécifiques pour chaque codon.

Mais ils réclament un soin particulier du fait de leur dénaturation rapide.

Pour la SP au Sénégal in vivo, excepté Guédiawaye où les niveaux d'échecs sont à 10.7% (tous les cas d'échecs notés sont survenus précocement avant J3), le niveau d'échec clinique à la sulfadoxine-pyriméthamine était globalement faible en 2001, passant de 5% au sud à 1,5% au nord [27]. Des études sur le génotypage de la DHFR et de la DHPS ont montré que les échecs cliniques correspondaient à des cas de résistance à la SP. Ainsi, cette tendance à l'augmentation progressive du niveau d'échec clinique du nord au sud du Sénégal fait déjà penser à une résistance des souches de *P.falciparum* à la SP.

Les taux élevés de résistance de *P.falciparum* à la SP observés notamment à Guédiawaye et dans la zone Sud du pays pourraient être liés à une pression médicamenteuse plus importante dans ces sites, du fait de leur position géographique qui en font des zones de brassage avec des mouvements importants de population et une activité économique intense.

Des études de chimiorésistance in vivo faites par Gaye (2002), dans le cadre d'un projet financé par l'USAID pour la réalisation d'activités de recherche durant la période allant de septembre 2001 à octobre 2002 sur la presque totalité du pays ont montré que *P. falciparum* a présenté un début de résistance face à l'association sulfadoxine-pyriméthamine. Les études ont porté sur 8 districts sélectionnés selon la stratification du paludisme : Richard-Toll au nord situé dans le faciès sahélien, Louga, Touba et Kaolack au centre en zone sahélo soudanienne, Guédiawaye en zone côtière dans la région de Dakar, Vélingara, Kédougou et Ziguinchor situés tous au sud en zone soudano guinéenne dans le faciès tropical. Les auteurs ont pu observer des taux d'échecs clinique qui varient en fonction de la position géographique et de l'activité économique. Ils ont trouvé des niveaux d'échecs cliniques faibles ; 1,7 % à Kédougou, 5,2 % à Vélingara, 3,3 % à Kaolack, 2,9 % à Richard-Toll, 2 % à Touba et 2 % à Louga. Seul Guédiawaye présente des niveaux d'échecs à 10,7 % [31]. Le taux plus élevé observé au niveau de Guédiawaye pourrait être lié à une pression médicamenteuse plus importante du fait de sa position géographique qui en fait une zone de brassage avec des mouvements importants de population et une activité économique intense.

Nos résultats montrent que la prévalence des souches mutées pour les codons 51, 59, et 108 ; n'est pas la même entre les différentes localités de collecte.

La mutation du codon 108 est présente dans presque tous les échantillons traités, elle est aussi la plus importante. Elle a été retrouvée dans plus de la moitié des souches mutées. Nous retrouvons aussi une prévalence relativement élevée des mutations 51. Les mutations au niveau du codon 59 sont plus faibles que celles des codons 51 et 108. Les pourcentages de mutations sont de l'ordre de 58%, 41% et 51% respectivement pour les codons 108, 59 et 51.

Nous constatons que la mutation au niveau du codon 108 est toujours accompagnée par au moins une autre mutation. Ce qui veut dire qu'en plus de la mutation du codon 108 on a les mutations additives des autres codons 51, 59, 437 et 540.

Au niveau du gène DHPS nous notons aussi une prévalence qui varie d'une localité à l'autre. Cependant le codon 437 présente un nombre plus élevé de mutation par rapport au codon 540. Nos résultats montrent une prévalence de 44% du codon 437 alors que celle du codon 540 ne représente que 4%.

Nos résultats vont dans le même sens que ceux de plusieurs auteurs.

Au Sénégal, des études menées par Ndiaye et al., en 2000 ont donné les résultats suivants : 71%, 53%, 46%, 17% , et 0% de mutations respectivement au niveau des codons 108, 51, 59, 437 et 540 sur 36 isolats au niveau du département de Pikine [15].

En 2002, ces mêmes auteurs ont obtenu 63%, 57%, 46%, 39% et 0% respectivement pour les mêmes codons.

Nous constatons une diminution des pourcentages de mutations observés de 2000 à 2002 surtout au niveau du codon 108.

A partir de l'année 2002, la prise d'antipaludique en monothérapie a été déconseillée. La sulfadoxine-pyriméthamine (SP) seule été uniquement recommandé pour la femme enceinte dans le cadre du TPI. Dans le traitement des accès palustres simples il était préconisé de l'utiliser en association avec un autre antipaludique, de préférence un dérivé de l'artémisinine.

Ces recommandations pourraient expliquer cette baisse de la prévalence de ces mutations entre 2000 et 2003 du fait certainement de la baisse de la pression de sélection.

Nos résultats vont aussi dans la même direction, c'est-à-dire une diminution du taux de mutations. Mais cependant ces taux restent encore élevés et peuvent s'expliquer par différentes causes (pression démographique, manque de personnel qualifié pour la prescription des médicaments, automédication, marchés parallèles).

En Afrique Centrale, Aubouy et al. trouvent au Gabon en 2003, les résultats suivants 63%, 83,3%, et 67,8% de mutations respectivement pour les codons 108, 51 et 59 [1].

En Tanzanie, des études ont mis en évidence des mutations de l'ordre de 66,9% pour le codon 108, 62,7% pour le codon 51, 43,7% pour le codon 59 et 39,2% pour le codon 540 [53].

Jelinek et al., ont trouvé pour le codon 108 un taux de mutations qui varie d'une zone à l'autre. En Afrique Centrale ils observent un pourcentage de 72,4% de mutations, 68,9% pour l'Afrique de Sud et 72,9% pour l'Afrique de l'Est [36].

La simple mutation a été retrouvée au niveau de tous les districts sanitaires mais, elle est plus importante au niveau du district de Vélingara avec un total de 28 soit 47,5%. La simple mutation représente 36% des échantillons

analysés. D'autres études menées en Afrique ont montré que la simple mutation n'était présente qu'en Afrique de l'Ouest (8,8%) [2].

La double mutation est aussi présente au niveau de tous les districts. Sa prévalence globale est de l'ordre 17% des échantillons analysés. Cependant elle était absente en 2003 dans les études de Ndiaye et al., et elle est signalée à Thiès en 2005 [51]. A Tambacounda et Pikine, elle avait été mise en évidence en 2003 [15], contrairement au Gabon où un taux relativement élevé (16,2%) et avoisinant le nôtre a été trouvé [1].

D'autres études menées en Afrique ont montré globalement 36,8% de la double mutation en Afrique de l'Ouest, 47,1% en Afrique de l'Est, 20,0% en Afrique Centrale et 66,7% en Afrique du Sud [2].

La triple mutation dans notre étude est de l'ordre de 28% et touche aussi toutes les localités. Une prévalence élevée de la triple mutation (108, 51 et 59) avait été notée à la fois à Thiès, Pikine [15] et Tambacounda [15,51].

D'autres études menées en Afrique de l'Ouest ont montré une prévalence de 41% en Guinée Bissau [48], 60% au Cameroun [7,20].

En Tanzanie, les études d'Erasto et al. en 2006, montrent que le pourcentage de triple mutation DHFR variait de 30% à 63% selon le site.

D'une façon générale, des études publiées en 2003 ont noté 29,4% de la triple mutation en Afrique de l'Ouest, 35,3% en Afrique de l'Est, 20,0% en Afrique centrale et 0% en Afrique du Sud [2].

Encore en Tanzanie Erasto et al. ont des mutations du gène DHPS variant entre 30% et 34%. Au Gabon, 71,8% ont présenté une triple mutation (108, 51 et 59) [23].

La quadruple mutation se localise au niveau de tous les sites d'études et se trouve être la moins importante, elle représente 4% des échantillons analysés.

Des études menées par Tahar R et al. en 2007, ont montré qu'au Cameroun son taux été de l'ordre de 55,2%. Ce qui est très élevé par rapport à nos résultats. On peut expliquer cet écart par le fait qu'au Cameroun, la SP est administrée en traitement. Et aussi la localisation géographique qui n'est pas la même ainsi que les conditions climatiques [6].

Les travaux d'Erasto et al., ont donné un pourcentage de quadruple mutation de l'ordre de 6,9% des échantillons analysés, ce dernier avoisine le taux trouvé dans notre étude [23]. La mutation du codon 108 est nécessaire pour entraîner la résistance tandis que, celles associées aux autres codons augmentent la résistance.

La quintuple mutation n'a pas été retrouvée.

Au vu de l'ensemble des études citées ci-dessus, il semble évident que les mutations observées varient en fonction de la position géographique et des politiques de traitement.

De nombreux travaux ont révélé que la présence de mutations au niveau du gène DHFR semble être liée à la résistance *in vivo* aux anti-métabolites notamment les anti-foliniques. C'est le cas de la sulfadoxine-pyriméthamine et du cycloguanil. Parmi ces travaux, nous pouvons citer Allico *et al.* qui en 2002 ont trouvé une forte proportion d'isolats mutants résistants à la sulfadoxine-pyriméthamine en Côte d'Ivoire, en observant des mutations du gène DHFR au niveau des codons 108, 51 et 59 [3]. De même Basco *et al.*, en 1998 ont remarqué qu'au Cameroun les isolats présentant la mutation S108N de DHFR seule ou associée à une mutation du codon 59, avaient une faible réponse clinique adéquate au Fansidar^R et ceux ayant trois mutations de DHFR entraînaient un échec thérapeutique précoce ou tardif [6].

Nous pouvons supposer que les mutations observées au cours de nos travaux pourraient être corrélées à une résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine.

Devant l'utilisation de la SP dans le cadre du TPI chez la femme enceinte, nous pensons qu'une surveillance de la prévalence des marqueurs de la résistance à la SP s'impose.

Pour diminuer la prévalence des mutations, il faudrait coupler la sulfadoxine-pyriméthamine à d'autres molécules.

Il sera intéressant de refaire cette étude après l'administration de la SP pendant un an pour voir l'impact de la prévalence de ces marqueurs de la résistance.

CONCLUSION

Le paludisme constitue un problème majeur de santé publique. Il est l'affection parasitaire la plus répandue dans le monde. Le Sénégal, où il existe de manière endémique, ne demeure pas en reste avec une forte recrudescence saisonnière. Malgré les multiples politiques de lutte, le paludisme persiste et représente la première cause de morbidité et de mortalité. Ceci est aggravé par l'apparition et l'extension de la chimiorésistance aux médicaments dans toutes les principales zones d'endémie palustre surtout en Afrique sub-saharienne. Une redéfinition des stratégies thérapeutiques et des perspectives de contrôle de la maladie s'impose. Les antipaludiques constituent la principale défense contre *Plasmodium falciparum* et la chloroquine, a longtemps été le médicament de première intention. Cependant l'apparition de la chimiorésistance, l'augmentation des souches chloroquino-résistantes de *P. falciparum*, s'est propagée rapidement, entraînant des échecs thérapeutiques qui ont contribué à augmenter la mortalité due au paludisme.

Ainsi à partir de l'année 2000 l'OMS a recommandé l'utilisation de combinaisons thérapeutiques pour la prise en charge des accès simples. De même le TPI à la SP chez la femme enceinte mais malheureusement pour les enfants de moins de cinq ans aucune politique de prévention n'était disponible. C'est pourquoi plusieurs études ont été menées pour évaluer le TPI à la SP chez les enfants et les nourrissons. C'est dans ce cadre que s'inscrit cette étude en collaboration avec l'UNICEF pour évaluer l'efficacité de cette stratégie. Cependant des préalables étaient nécessaires, à savoir la mesure de la prévalence des marqueurs de la résistance à la SP.

A partir de 2000 la sulfadoxine-pyriméthamine était devenue avec l'Amodiaquine, la seule disponible pour un traitement à coût acceptable de l'accès présumé paludéen dans les pays où la chloroquino-résistance est

fréquente. Une surveillance régulière de l'efficacité de ces molécules était indispensable surtout avec l'avènement des combinaisons d'antipaludiques. La biologie moléculaire en particulier la PCR constitue un nouvel outil à côté des méthodes classiques (tests in vitro et in vivo) pour étudier cette efficacité.

Beaucoup de travaux ont démontré une liaison étroite entre les mutations de la DHFR et la résistance de *plasmodium falciparum* à la SP et une liaison complète entre les mutations multiples de la DHFR et cette résistance.

Ces études moléculaires constituent un bon signal d'alarme pour alerter les décideurs politiques quant aux choix de politiques de prévention ou de traitement du paludisme.

La découverte d'un vaccin efficace pourrait s'avérer être le meilleur moyen de lutte et de protection contre le paludisme. Plusieurs types de vaccins ont été élaborés ou sont en cours, mais aucun n'a encore donné entière satisfaction. Cependant les importants progrès réalisés permettent d'espérer une issue favorable à cette situation.

Résumés

خلاصة :

المالاريا، هي مرض كريات الدم الحمراء يسببه « hématozoaire » من فصيلة بلاسموديوم (Plasmodium). ينتقل عن طريق لسعة البعوضة الأنثى (anophèle). النوع بلاسموديوم فالسيباروم مسئول عن 75% من حالات المالاريا في العالم أي حوالي 20% من نسبة الوفيات لدى الأطفال دون سن الخامسة.

هذه الدراسة- نسبة الجينات Dihydrofolete Réductase (DHFR) و Dihydroptéorate Synthétase) DHPS مؤشر الجزيئي للمقاومة ضد السولفادوكسين- بيريميتامين، أجريت هذه الدراسة على 220 عينة في شهر يناير 2007 في إقليم تامباكوندا و الأقاليم الثلاثة: كيدوكو، فيلينكرا و سريا في السنيغال.

العينات على ورقة التصفية كانت إيجابية بعد قراءة استخلصت بالمتانول. و قد طبق على نفس العينة PCR متبوعة بهضم انزيمي لجينات DHPS فقط و électrophorèse لجميع الجينات.

لقد بينت النتائج نسبة 85% من التحول (mutation) عند العينة المفحوصة و أكبر نسبة لل Codon 108، أي نسبة 58%. بينما التحول البسيط هو الأكثر انتشارا لدى 36% من الحالات. التحول الخماسي لم يحصل عليه.

و سيكون مهما تعميم هذه الدراسة على كل تراب الوطن للتعرف أكثر على مدى انتشار نسبة تحول الجينات DHFR و DHPS و الحساسية الحيوية ضد السولفادوكسين- بيريميتامين للنوع بلاسموديوم فالسيباروم

Le paludisme est une érythrocythopathie due à un hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmis par la piqûre de moustique, l'anophèle femelle. L'espèce *Plasmodium falciparum* est responsable de 75% des cas de paludisme dans le monde et représente 20% de la mortalité chez les enfants de moins de 5ans.

Notre étude, prévalence des gènes DHFR (Dihydrofolate Réductase) et DHPS (Dihydroptéorate Synthétase) marqueurs moléculaires de la résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine), a porté sur 220 prélèvements qui ont été effectués au mois de janvier 2007. Ces derniers ont concerné le district témoin de Tambacounda et trois districts tests : Kédougou, Vélingara et Saraya, au Sénégal.

Les prélèvements sur papier filtre, qui étaient positifs après lecture de la goutte épaisse et du frottis sanguin, ont été extraits par le méthanol. Une PCR classique a ensuite été appliquée à ces mêmes échantillons suivie d'une digestion enzymatique uniquement pour le gène DHPS et d'une électrophorèse pour les deux gènes.

Les résultats ont montré une prévalence de 85% de mutation au niveau des échantillons analysés avec la plus importante prévalence pour le codon 108, soit 58%.

Cependant la simple mutation est la plus fréquente chez 36% des cas. La quintuple mutation n'a pas été retrouvée.

Aussi, il serait intéressant de généraliser cette étude sur tout le territoire national pour mieux connaître l'étendue de la prévalence par zone des mutations des gènes DHFR et DHPS et la sensibilité in vivo des souches de *P. falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques :

- [1]- **Aubouy A., Jafari S., Huart V., Migot-Nabias F., Mayombo J., Durand R., Bakary M., Le Bras J. and Deloron P.** *DHFR* and *DHPS* genotypes of *Plasmodium falciparum* isolates from Gabon correlate with *in vitro* activity of pyrimethamine and cycloguanil, but not with sulfadoxine– pyrimethamine treatment efficacy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2003) 52, 43-49
- [2]-**Annie-Claude Labbé, Samir Patel, Ian Crandall, and Kevin C. Kain**
A Molecular Surveillance System for Global Patterns of Drug Resistance in Imported Malaria. *Emerg Infect Dis* 2003 Jan
- [3]-**Allico J. D., Basco L. K. et Mazabraud A., 2002.** Mise en place d'un système de surveillance de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* à Yopougoun (Abidjan) : étude *in vivo* de la sensibilité à la chloroquine et évaluation de la résistance à la pyriméthamine après analyse de mutation ponctuelle du gène de dihydrofolate réductase. *Cahier santé* ; **12** : 363-7 pp.
- [4]-**Bâ-Fall F., 2000.** Le paludisme en zone mésoendémique: relation entre la transmission, l'infection et la morbidité palustre à Ndiop (Sénégal). *Thèse de troisième cycle de Biologie animale* ; 51 : 10-14 pp
- [5]- **Basco LK, Le Bras J, Rhoades Z & Wilson MC.** Analysis of *pfmdr1* and drug susceptibility in fresh isolates of *Plasmodium falciparum* from Sub-Saharan Africa. *Mol Biochem Parasitol*, 1995, 74, 157-166.
- [6]-**Basco, L.K., R. Tahar, and P. Ringwald.**
Molecular basis of *in vivo* resistance to Sulfadoxine-pyrimethamine in African adult patients infected with *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *Antimicrob Agents Chomother.* 1998 ; **42**:1811-1814.
- [7]-**Basco LK, Same Ekobo A, Foumane Ngane V.**
Therapeutic efficacy of sulfadoxine-pyrimethadine, amodiaquine and the sulfadoxine- pyrimethadine-amodiaquine combination against uncomplicated

Plasmodium falciparum malaria in young children in Cameroun. *Bull. World Health Org* 2002 ; 80: 538-45.

[8]-Bogard M, Lamoril J. Biologie moléculaire en Biologie Clinique. Elsevier 1998, 348p.

[9]-Bray PG , Mungthin M, Ridley RG & Ward SA. Access to hematin: the basis of chloroquine resistance. *Molec pharmacol.*,1998,**54**: 170-179.

[10]-Bray PG & Ward SA.

A comparison of the phenomenology and genetics of multidrug resistance in cancer cells and quinoline resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol Ther*, **1998**, **77**, **1-28**.

[11]- Breman JG. The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants and estimates of the malaria burden. *Am J Trop Med Hyg*, 2001; 64 : 1-11.

[12]-Carlton J, Mackinnon M & Walliker D. A chloroquine resistance locus in the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi*. *Mol Biochem Parasitol*, 1998, 93: 57-72.

[13]-Carnevale P., Robert V., Boudin C., Halna JM., Pazart L., Gazin P., et al. La lutte contre le paludisme par des moustiquaires imprégnées de pyréthrine au BURKINA-FASO. *Bull. Soc. Path. Exo.* 1988 ;81 :832-42

[14]-Ripert C., Pajot F., Vincendeaux P., et Gomez F. Epidémiologie des maladies parasitaires. P 78-88.

[15]-D. Ndiaye, J. P. Daily, O. Sarr, O. Ndir, O. Gaye, S. Mboup and D. F. Wirth. Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes in Senegal. *Trop. Med. Int Health. Volume 10 NO II pp1176-1179 November 2003.*

[16]-D. Syafruddin, Puji D. S. Asih, Sona L Aggarwal, Anuraj H. Shankar. Frequency distribution of antimalarial drug-resistant alleles among isolates of *Plasmodium falciparum* in purworejo district, central java province, Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 69 (6), 2003 / pp. 614-620.

- [17]- **Diagne N., Fontenille D., Konaté L., Faye O., Lamizana M. T., Legros F., Molez J. F. et Trape J. F., 1994.** Les Anophèles du Sénégal : liste commentée et illustrée. *Bull. Soc. Path.* ; **87** : 267-277 pp.
- [18]-**Diallo S., Ndir O., Faye O., Diop B. M., Dieng Y., Bah I. B., Dieng T., Gaye O., Konaté L. et Faye O., 1998.** Le paludisme dans le district sanitaire de Dakar (Sénégal). Parasitémie et accès paludéens. *Bull. Soc. Path.* ; **91** : 208-213 pp
- [19]- **Dicko A, Sagara I, Sissoko M, Guindo O, Diallo A, Kone M, et al.** Impact of intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine targeting the transmission season on the incidence of clinical malaria in children 6 months to 10 years in Kambili, Mali.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 2004. 71 Suppl abstract. 18.
- [20]-**Diop BM, Faye-Ndao MA, Sow P, Feller-Dansokho E, Sene I, Ndour CT, Coll-Seck A.** Le paludisme à Dakar: aspects épidémiologiques cliniques et parasitologiques. *Forum médical 1993; 1*: 6-8.
- [21]-**Duraisingh MT, Drakeley CJ, Muller O, Bailey R, Snounou G et al.,** Evidence for selection for the thyrosine-86 allele of the pfmdr 1 gene of *Plasmodium falciparum* by chloroquine and amodiaquine.
Parasitology, **1997, 114: 205-211.**
- [22]-**Durand R, Gabette E, DI Pizza JP, De Labre JF & Le Bras J**
Analysis of kappa and omega repeats of cg2 gene and chloroquine susceptibility in fresh isolates of *P.falciparum* from sub-saharan Africa.
Molec Biochem Parasitol, **1999, 101: 185-197.**
- [23]-**Erasto V Mbugi, Benezeth M Mutayoba, Allen Malisa, Sakurani T Balthazary, Thomas Mshinda.** Drug resistance to sulphadoxine-pyriméthamine in *Plasmodium falciparum* malaria in Mlimba, Tanzania.
Malaria journal 2006
- [24]-**Eskandarian,A.,H.Keshavarz, L.K. Basco,and F.Mahboudi.**

Do mutations in *plasmodium falciparum* dihydropteroate synthase and dihydrofolate reductase confer resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in Iran. *Trans.R. Soc. Med.Hyg.* 2002; **96**: 96-98.

[25]-Etard JF, Delaunay V, Le Hesran JY, Ndiaye JL, Diallo JP and Niakhar Project group. Childhood mortality and probable causes of death using verbal autopsy in Niakhar, Senegal, 1989-2000. *Int J Epidemiol.* 2004 Dec; 33(6):1286-92.

[26]-Faye O., Fontenille D., Hervé J. P., Diack P. A., et Mouchet J., 1993. Le paludisme en zone sahalieenne du Sénégal. Données entomologiques sur la transmission. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* ; **73** : 21-30 pp.

[27]-Fontenille D., Lochouarn Diatta M., Sokhna C., Dia I., Diagne N., Lemasson J. J., Bâ K., Tall A., Rogier C. et Trape J. F., 1997a. Four years entomological study of the transmission of seasonal malaria in Senegal and the bionomics of *Anopheles gambiae* and *Amopheles arabiensis*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*; **91**: 647-652 pp.

[28]-Fontenille D., Lochouarn, Diagne N., Sokhna C., Lemasson J. J., Diatta M., Konaté L., Faye, O., Rogier C. et Trape J. F., 1997b. High annual and seasonal variations in malaria transmission by anophelines and vector species composition in Dielmo, a holoendemic area in Senegal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* ; **56** : 247-253 pp

[29]-Fidock D.A., Nomura. T., Talley. A.K., Cooper. R.A., Dzekunov.S.M., Ferdig. M.T. Mutation in the *Plasmodium falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol cell.* 2000; **6**: 861-871.

[30]-Gatton, M. L ., W. Hogarth, and A. Saul. Time of treatment influences the appearant of drug resistance parasites in *Plasmodium falciparum* infections. *Parasitology.*2001; **123**: 537-546

[31]-Gaye O et al. Surveillance de la chimiorésistance du paludisme au Sénégal.

Rapport final Décembre 2002.

[32]-**Gerrard L.** In eucaryotes. itiation aux techniques de clonage, de séquençage et d'expression des gènes eucaryotes. *ABC de génie génétique, Inter Ed, Paris.*

[33]- **Greenwood BM, Greenwood AM, Bradley AK, Snow RW, Byass P, Hayes RJ, et al.** Comparison of two strategies for control of malaria within a primary health care programme in the Gambia. *Lancet* 1988, 1121-7.

[34]-**Hastings, I. M., W. M. Watkins, and N. J. White.** The evolution of drug resistant malaria: the role of drug elimination half life. *Phil. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci.* 2002; **357**: 505-519.

[35]-**Innis MA, Gelfand DH.** Optimization of PCR. In PCR Protocols: A guid to methods and Applications. *Academics press Inc*, 1990: 3-12.

[36]- **Jelinek, T., A. M Ronn, M. M. Lemnge, J. Curtis, J. Mhina, M. T. Duraisingh, I., C. Bygbjerg, and D. C . Warhursp.** Polymorphism in the dihydrofolate reductase (DHFR) and dihydropteroate synthetase (DHPS) genes of *Plasmodium falciparum* in vivo resistance Sulfadoxine/Pyriméthamine in iso Late from Tanzania. *Trop. Med. Int. Health.* 1998; **3**:605-609.

[37]-**Ju LY, Charron.** Typage HLA de classe II par amplification d'ADN et digestion avec des endonucléases spécifiques d'allèles. In amplification enzymatique des séquences nucléotidiques par PCR. *INSERM*: 31-42.

[38]-**Kaplan JC, Delpech M.** Biologie Moléculaire et Medecine 1990. *Med. Scie.Flammarion.*

[39]-**Kayentao K., Kadioi M., Newman RD. et al.** Comparison of intermittent preventive treatment with chemoprophylaxis for the prevention of malaria during pregnancy in MALI. *JID* 2005; 191: 106-16

[40]-**Kocher TD, Wilson AC.** DNA amplication by a polymerase chain reaction. In Essential Molecular Biology: A pratical approach. *IRL PRESS OXFORD*, 1993, 2:185-208.

- [41]-**Kong H, Kucera RG, Jack WE.**Characterization of a DNA polymerase from the hyperthermophyile archaeothermococcus litoralis. Vent DNA polymerase. Steady State kinetics, thermal stability, processivity, strain displacement, and exonuclease activities. *J Biol Chem*,1993, 268:1965-75.
- [42]-**Le Bras J.** La situation des chimiorésistances du paludisme en Afrique. *Med Trop* 1995 ; 55 : 9-13.
- [43]-**Le Bras J, Durand R, Di Piazza JP, Pradines B, Longuet C & Parzys D.** Prise en compte des disparités de résistance de *P.falciparum* en Afrique dans la décision chimioprophylactique. *3Presse Med*, 1998, 27 :1419-1423.
- [44]- **Massaga J. J., Kitua A. Y., Lemnge M. M., Akida J. A., Theander T. G. and Bygbjerg I. C. (2003).** Effect of intermittent treatment with amodiaquine on anaemia and malarial fevers in infants in Tanzania: A randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 361: 1853-60.
- [45]-**Mouchet J, Carnevale P.** Les vecteurs de la transmission du paludisme. *Edition Marketing Ellipses/AUPEL, Paris, 1991: 35-8.*
- [46]-**Mullis KB.** The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990, 262: 56-61, 64-5.
- [47]-**Mutabingwa T.** Antimalarial Intermittent Treatment during pregnancy in Africa. *PREMA-EU Newslater*,2002;1:4-6
- [48]-**Nagesha, H. S., Dine-Syafruddin, G. J. Casey, A. I. Susanti, D. J. Fryauff, J. C. Reeder, and A. F. Cowman.** Mutations in *pfmdr1*, *dhfr* and *dhps* genes of *Plasmodium falciparum* are associated with in-vivo drug resistance in west Papua, Indonesia. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2001; **95**: 43-49.
- [49]-**Nzila-Mouda A, Mberu EK, Sibley CH, Plowe CV, Winstanley PA & Watkins WM.** Kenyan *P.falciparum* field isolates: correlation between pyrimethamine and cycloguanil.
- [50]-**O. SY ; JL. Ndiaye ; N. SY ; L. Konaté ; O. Gaye (2006).** Étude de quelques aspects épidémiologiques et environnementaux du paludisme au Sénégal. Mémoire

De DEA De Sciences Biologiques et Médicales. U. C. A. D Dakar Fac. Med 2006 N° 45

[51]- **Séne P. D.** Etude des mutations génétiques associées à la résistance de *Plasmodium.falciparum* à la Sulfadoxine pyriméthamine au Sénégal.

Thèse de Pharmacie, UCAD 2005.

[52]-**Programme de lutte contre le paludisme.** Atelier national de consensus sur la politique de traitement antipaludique au Sénégal. *Juin,2003, 70pp.*

[53]-**Roper Cally.** Molecular Determination of Point Mutation Haplotypes in the Dihydrofolate Reductase and Dihydropteroate Synthase of *Plasmodium falciparum* in Three Districts of Northern Tanzania. *Antimicrobial. Agents and Chemotherapy, April 2003, p. 1347-1354, Vol. 47, n° 4.*

[54]-**Scott JA, Brogdon WG, Collins FH.** Identification of single specimens of the anopheles gambiae complex by the polymerase chain reaction.

Am J Trop Med Hyg, 1993, 49:520-529.

[55]-**Seck P. A., 2003.** Etude la tolérance et de l'efficacité de la quinine diluée, administrée par voie intra rectale dans le traitement du paludisme non compliqué de l'enfant en milieu rural sénégalais. *Thèse Med. Dakar ; 25: 8-8 pp. UCAD*

[56]- **Schellenberg D., Menendez C., Kahigwa E., Aponte J., Vidal J., Tanner M., Mshinda H. and Alonso P. (2001).** Intermittent treatment for malaria and anaemia control at time of routine vaccinations in infants: A randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 357: 1471-7.

[57]-**Simpson, J. A., E. R. Watkins, R. N. Price, L. Aarons, D. E. Kyle, and N. J. White.** Mefloquine Pharmacokinetic-pharmacodynamic models: implications for dosing and resistance. *Antimicrob. Agents Chemother. 2000; 44: 3414-3424.*

[58]-**Sirawaraporn W, Sathitkul S, Sirawaraporn R, Yuthavong Y & Santi DV.** Antifolate-resistant mutants of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. *Proc Nat Acad Sc USA, 1997, 94: 1124-1129.*

- [59]-Su XZ, Kirkman LA, Fujioka H & Wellems TE. Complex polymorphism's in a 330-KDa protein are linked to chloroquine resistant *P.falciparum* in Southeast Asia and Africa. *Cell*, 1997;**91**: 593-603.
- [60]-Taylor GR. Polymerase chain reaction: basic principal and automation. In PCR: A Pratical Approach. *IRL PRESS, OXFORD*, 1993, 1: 47-48.
- [61]-Trape J. F., Pison G., Presiozi M. P., Enel C., Desgrées du Lou, Delaunay V., Samb B., Lagarde E., Molez J. F. et Simondon F., 1998. Impact of resistance on malaria mortality. *C. R. Acad. Sci. Paris, Science de la vie (Life Science)* ; **321** : 689-697 pp.
- [62]-Triglia, T., J. G. Menting, C. Wilson and A. F. Cowman. Mutations in dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulphonamide resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; **94**: 13944-13949.
- [63]-Vasconcelos, K. F., C. V. Plowe, C. J. Fontes, D. Kyle, D. F. Wirth, L. H. Pereira da Silva, and M. G. Zalis. Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate Synthase of isolates from Amazone Region in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2000; **95**: 721-728.
- [64]-Wang P, Lee CS, Bayoumi R, Djimde A, Doumbo O, Swedberg G, Dao L, Mshinda H, Tanner M, Watkins WM, Sims PFG, Hyde JE. Resistance to antifolates in plasmodium falciparum monitored by sequence analysis of dihydropteroate synthetase and dihydrofolate reductase alleles in a large number of field samples of divers origins. *Mol. Biochem. Parasitol.*1997; **89**: 161-177
- [65]-Wang P., Read M., Sims PFG., Hyde J.E. Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilisation. *Mol. Microbiol.* 1997; **23**: 979-986.
- [66]-Wang, P., C. S. Lee, R. Bayoumi, A. Djimde, O. Doumbo, G. Swedderg, L. D. Dao, H. Mshinda, M. Tanner, W. M. Watkins, P. F. Sims, and J. E.

Hyde. Resistances in antifolates in *Plasmodium falciparum* monitored by sequence analysis of dihydropteroate synthetase in dihydrofolate reductase alleles in large number of field samples of diverse origins.

Mol. Biochem Parasitol. 1997; **89**: 161-177.

[67]-**Wang, P., M. Read, P. F. Sims, and J. E. Hyde.** 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.* 1997; **23**: 979-986.

[68]-**White, N.** Antimalarial drug resistance and combination chemotherapy.

Phil. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci. 1999; **354**: 739-749.

[69]-**World Health Organization.** *Africa Malaria report 2003.*

<http://www.who.int/amd2003/amr2003.htm>

[70]-**Who (2005).** World malaria report. *RBM/WHO/UNICEF, Geneva 2005.*

[71]-**Zoguéréh et al.** Cahiers d'études et de recherches francophones/Santé. Volume 10, numéro 6, 425-33, Novembre-Décembre 2000, Synthèse

[72]-**Fall I. S., Ba-Fall K. M., Gning S. B., Ndoye S., Diop I., Wade B.**

Prophylaxie du paludisme dans les armées: L'expérience du Sénégal

Med Trop 2001 : 61 : 83-86.

[73]-**Ndiaye M.** Prévalence du gène DHFR, marqueur génétique de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine dans les régions de Thiès et Tambacounda. Mémoire De DEA de Science Biologiques et Médicales 2006, Dakar ;

UCAD

Webographie:

[74]-<http://fr.wikipedia.org/wiki/Paludisme>

[75]-www.casafree.com/modules/news/article.php?storyid==15113

ANNEXES

District sanitaire de **Kédougou** : répartition des postes de santé, des patients et des mutations.

SALEMATA

	DHFR			DHPS		1	2	3	4	5
	51	59	108	437	540	mutation	mutations	mutations	mutations	mutations
N°10	S	S	M	S	S	X				
N°01	S	S	S	M	S	X				
N°18	S	S	S	S	S					
N°14	S	M	M	M	S			X		

N°05	S	S	S	S	S					
N°15	M	S	S	S	S	X				
N°02	S	S	S	S	S					
N°16	S	M	S	S	S	X				
N°13	S	S	S	S	S					
N°44	S	S	S	M	S	X				
N°40	S	M	M	M	S			X		
N°52	S	S	M	S	S	X				
N°09	S	S	S	S	S					
N°18	M	M	S	S	S		X			
N°14	M	S	M	S	S		X			
N°40	S	S	M	S	S	X				

DINDIFELLO

N°09	M	M	M	M	S				X	
N°31	M	M	M	S	S			X		
N°14	M	M	M	M	S				X	
N°07	S	S	S	M	S	X				
N°58	S	S	S	M	S	X				
N°63	S	S	S	M	S	X				
N°46	M	M	M	S	S			X		
N°36	S	S	S	M	S	X				
N°22	S	S	S	M	S	X				
N°53	M	M	M	S	S			X		

SARAYA

N°10	S	S	M	M	S		X			
N°20	S	S	M	M	S		X			
N°30	S	S	S	M	S	X				
N°32	M	M	M	M	S				X	
N°61	S	S	S	M	S	X				
N°64	M	M	S	M	S			X		
N°68	S	S	S	M	S	X				
N°87	S	M	M	M	S			X		
N°88	S	S	S	M	S	X				

N°71	S	M	M	M	S			X		
N°14	-	-	-	-	-					
N°15	-	-	-	-	-					
N°79	-	-	-	-	-					
N°86	-	-	-	-	-					

NAFADJI

N°17	-	-	-	S	S					
N°41	S	S	M	S	S	X				
N°43	S	S	S	S	S					
N°53	S	M	M	M	S			X		
N°08	S	M	S	S	S	X				
N°13	S	S	S	S	S					
N°15	M	M	M	S	S			X		
N°40	M	M	M	S	S			X		
N°47	S	S	M	S	S	X				
N°55	S	S	S	S	S					
N°08	S	S	M	S	S	X				

NEPENE

N°07	S	S	M	S	S	X				
N°08	-	-	-	-	-					
N°11	-	-	-	-	-					
N°12	-	-	-	-	-					
N°14	-	-	-	-	-					
N°26	S	S	S	S	S					
N°29	S	M	M	M	S			X		
N°34	-	-	-	-	-					
N°39	-	-	-	-	-					
N°44	S	S	M	M	S		X			
N°46	-	-	-	-	-					
N°50	-	-	-	-	-					
N°51	S	S	S	M	S	X				
N°54	-	-	-	-	-					
N°58	-	-	-	-	-					
N°59	-	-	-	-	-					

N°61	-	-	-	-	-					
N°67	-	-	-	-	-					

District sanitaire de **Vélingara** : répartition des postes de santé, des patients et des mutations.

LINKERING

N°03	S	S	M	S	S	X				
N°28	-	-	-	S	S					
N°29	S	M	M	S	S		X			
N°30	S	S	S	S	S					
N°34	M	M	M	S	S			X		
N°41	S	S	M	S	S	X				
N°42	S	M	S	S	S	X				
N°48	S	S	S	S	S					
N°50	M	M	M	S	S			X		
N°51	M	M	M	M	S				X	
N°52	-	-	-	S	S					
N°54	S	S	S	S	S					
N°64	M	M	M	S	S			X		
N°65	-	-	-	S	S					
N°66	S	S	S	S	S					
N°67	S	M	M	M	S			X		
N°69	-	-	-	S	S					
N°73	S	M	S	S	S	X				
N°74	-	-	-	S	S					
N°75	M	S	M	S	S		X			

SARE COLY

N°70	S	S	S	M	S	X				
N°20	S	S	M	M	S		X			
N°30	S	S	M	M	S		X			
N°04	S	M	M	M	S			X		
N°86	M	M	S	M	S			X		
N°29	S	M	M	M	S			X		
N°34	S	S	S	M	S	X				

N°64	S	M	M	M	S			X		
N°15	S	M	M	S	S		X			

KOUNKANE

N°02	S	S	S	S	S					
N°17	S	S	S	S	S					
N°19	S	S	M	M	S		X			
N°30	-	-	-	-	-					
N°33	M	M	S	M	S			X		
N°39	S	S	S	S	S					
N°41	S	M	S	M	S		X			
N°45	S	M	S	M	S		X			
N°47	S	S	S	M	S	X				
N°52	S	S	M	M	S		X			
N°53	S	M	M	M	S			X		
N°58	-	-	-	-	-					
N°59	-	-	-	-	-					

MEDINA DIAGNETTE

N°02	-	-	-	S	S					
N°23	S	S	-	M	S	X				
N°37	-	-	-	S	S					
N°16	S	S	M	S	S	X				
N°51	S	S	S	M	S	X				
N°26	S	M	M	M	S			X		
N°15	S	S	S	M	S	X				
N°05	-	-	-	S	S					
N°61	-	-	-	S	S					
N°12	S	M	M	M	S			X		
N°58	S	S	M	S	S	X				
N°39	M	M	M	M	S				X	
N°32	S	S	S	M	S	X				
N°09	S	S	M	M	S		X			
N°36	S	M	S	S	S	X				
N°19	S	M	M	S	S		X			

PAROUMBA

N°08	-	-	-	S	S					
N°03	S	M	M	S	S		X			
N°11	-	-	-	S	S					
N°12	M	S	M	M	S			X		
N°17	S	S	S	S	S					
N°48	S	S	S	M	S	X				
N°40	S	S	M	S	S	X				
N°50	-	-	-	-	-					
N°42	S	S	S	M	S	X				
N°47	S	S	S	M	S	X				
N°38	S	M	M	M	S			X		
N°56	M	M	M	S	S			X		
N°43	S	M	M	M	S			X		
N°41	S	M	S	S	S	X				
N°37	M	M	M	M	S				X	
N°21	-	-	-	S	S					
N°28	-	-	-	S	S					
N°30	-	-	-	S	S					
N°34	-	-	-	S	S					
N°35	S	S	M	M	S		X			
N°60	S	S	S	M	S	X				
N°61	M	M	M	S	S			X		
N°62			-	-	-					
N°68	M	M	M	S	S			X		
N°69	-	-	-	-	-					

WASSADOU

N°01	S	S	S	S	S					
N°02	S	S	S	S	S					
N°03	-	-	-	S	S					
N°04	M	M	M	S	S			X		
N°10	-	-	-	S	S					
N°20	S	S	S	S	S					
N°25	S	S	S	S	S					
N°26	S	M	S	S	S	X				
N°29	M	M	M	S	S			X		
N°35	S	S	M	S	S	X				
N°43	M	M	M	S	S			X		
N°47	S	S	M	S	S	X				

N°54	M	M	M	S	S			X		
N°62	-	-	-	S	S					
N°69	M	M	M	S	S			X		
N°71	S	S	M	S	S	X				
N°76	M	M	M	S	S			X		
N°79	-	-	-	S	S					

SINTHIAN KOUNDARA

N°03	S	S	S	S	S					
N°26	S	S	M	S	S	X				
N°30	-	S	M	S	S	X				
N°31	-	M	M	M	S			X		
N°42	S	M	M	M	S			X		
N°53	-	S	M	S	S	X				
N°63	S	S	S	M	S	X				
N°68	S	M	M	S	S		X			

District sanitaire **Tambacounda** : répartition des postes de santé, des patients et des mutations.

NETEBOULOU

N°40	-	-	S	S	S					
N°52	-	S	S	S	S					
N°72	-	-	S	S	S					

BIRA

N°12	S	M	M	M	S			X		
N°19	S	S	M	M	S		X			
N°30	M	M	M	S	S			X		
N°31	-	-	-	M	S	X				
N°34	S	S	S	M	S	X				
N°36	-	-	-	S	S					
N°41	S	M	M	M	S			X		

N°49	-	-	-	S	S					
N°53	M	S	M	S	S		X			
N°58	-	-	-	S	S					

SINTHIOU MALEME

N°34	S	M	M	M	M				X	
N°48	-	-	S	S	S					
N°49	S	M	M	M	S			X		
N°50	M	S	M	S	S		X			
N°61	S	S	M	M	S		X			
N°64	-	-	-	-	S					
N°67	S	M	M	S	S		X			
N°70	-	-	-	M	S	X				

KOUSSANAR

N°23	S	S	M	S	M		X			
N°43	M	S	M	S	M			X		
N°53	S	M	S	S	S	X				
N°59	S	S	M	S	S	X				
N°61	S	S	S	S	M	X				
N°62	M	S	M	S	S		X			
N°69	S	S	M	S	S	X				
N°71	M	M	M	S	S			X		
N°76	S	S	M	S	S	X				
N°72	S	M	M	S	M			X		
N°17	S	S	S	S	M	X				

District sanitaire de Saraya : répartition des patients et des mutations.

SARAYA

N°10	S	S	M	M	S		X			
N°20	S	S	M	M	S		X			
N°30	S	S	S	M	S	X				
N°32	M	M	M	M	S				X	

N°61	S	S	S	M	S	X				
N°64	M	M	S	M	S			X		
N°68	S	S	S	M	S	X				
N°87	S	M	M	M	S			X		
N°88	S	S	S	M	S	X				
N°71	S	M	M	M	S			X		
N°14	-	-	-	-	-					
N°15	-	-	-	-	-					
N°79	-	-	-	-	-					
N°86	-	-	-	-	-					

PAKOUR et PONT

N°20	S	S	S	S	S					
N°55	S	S	S	S	S					
N°65	S	S	S	S	S					
N°11	S	S	M	M	S		X			

S : sauvage

M : mutant

X : type de mutation