

Ministère de l'Enseignement Supérieur  
Et de la Recherche Scientifique

République du Mali

Un peuple - Un but - Une foi



UNIVERSITE KANKOU MOUSSA  
FACULTE MIXTE DES SCIENCES DE LA  
SANTE (MEDECINE ET PHARMACIE)



Année Universitaire : 2022-2023

Thèse N°018/23

## THESE

Evaluation des marqueurs moléculaires de la résistance  
de *Plasmodium falciparum* à la sulfadoxine-  
pyriméthamine et à l'amodiaquine après sept cycles de  
chimio-prévention du paludisme saisonnier dans le  
district sanitaire de Moïssala, Tchad

Présentée et soutenue publiquement le **03/08/2023**

Devant la Faculté Mixte des Sciences de la Santé (Médecine et Pharmacie) de  
l'Université KANKOU MOUSSA

**Par M. Moussa DOUMBIA**

Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine (*Diplôme d'Etat*)

### Jury :

**Président : Pr Abdoulaye DJIMDE**

**Membre : Dr Bakary Fofana**

**Co-directeur : MC Souleymane DAMA**

**Directeur : MCA Abdoulaye Kassoum Kone**

# DEDICACE ET REMERCIEMENTS

**DEDICACE**

**A la mémoire de ma chère mère feu Rachel KONE**

Tu avais prédit ce jour avant même qu'il ne soit ; ta confiance en ma personne m'a toujours donné des ailes, ce travail est le tien. Tu fus un modèle pour tes enfants, une mère courageuse, joviale, forte devant les épreuves et qui savait toujours reconforter les personnes qui traversaient les dures épreuves de la vie. Ton amour du prochain, ta capacité à pardonner et ta libéralité sans condition sont des qualités parmi tant d'autres que tu nous as laissés.

Nous chérissons jalousement les moments vécus en ta présence, chère mère et nous remercions le seigneur pour ta vie.

A présent, tu te reposes de tes œuvres selon la parole de Dieu.

## REMERCIEMENTS

### **A l'Éternel Jéhovah mon Seigneur et mon Dieu**

Louange et Gloire à Toi Seigneur Jésus pour ta protection et ton assistance tout au long de ma vie.

### **A mon cher père Soungalo dit Samuel DOUMBIA :**

Impressionné par ta foi en Dieu et ton amour pour les choses de l'éternel, homme de foi, de principe, un exemple en dignité, en bravoure qui s'est battu et tu continues de le faire pour le bonheur de tes enfants. Nous continuons de voir l'impact de tes prières dans nos vies. Voici le fruit de ton travail ; merci pour tout ce que tu as fait et que tu continues à faire pour nous. Que l'éternel te garde le plus longtemps possible auprès de nous en bonne santé.

### **A mes bien-aimé(e)s frères et sœur :**

Alemiel, Daniel, Josué, Nema, Joël et Pascal

Je sais la fierté que vous affichez à mon égard, vos soutiens sans faille et votre amour pour le benjamin que je suis nous a permis d'arriver ensemble à ce résultat, je tiens donc à vous exprimer ma profonde gratitude.

Amour fraternel !

### **A mon grand frère Daniel DOUMBIA et Famille :**

Une mention singulière pour toi en ce jour, un frère qui s'est investi dans mes études et continue de veiller là-dessus, tu t'es senti très tôt responsable de ma réussite scolaire depuis le primaire jusqu'à ce jour.

Ce travail est le fruit de ton sacrifice et de ton investissement en ma personne.

Ces quelques lignes ne pourront jamais exprimer ce que vous avez fait pour moi, au-delà des mots ma profonde gratitude ; que Dieu vous protège et vous prête bonne santé et longue vie.

### **A ma très chère et tendre épouse Mariam DEMBELE**

Tu es une bénédiction ma tendre et respectueuse épouse. Tu as été d'une aide précieuse durant l'élaboration de ce travail par ta présence, ta patience, ton affection et ton soutien. Nous voir le réaliser ensemble est une grâce. Puisse DIEU fortifier notre union en Christ.

### **A mon oncle Abel KONE et famille à Sikasso**

Merci de m'avoir accompagné et encouragé depuis l'apprentissage des soins infirmiers sous ton bon soin et jusqu'au terme de mes études en médecine. Tes conseils n'ont jamais manqué.

Que Dieu te prête bonne santé et longue vie.

**A ma tante Koniba Kone et famille**

Chère Tante, merci pour ton soutien indéfectible dont tu as fait preuve.

Dieu vous garde aussi longtemps auprès de nous en bonne santé.

**A la grande famille DOUMBIA**

Un grand merci pour vos encouragements durant ce parcours.

**A la famille DEMBELE**

Papa Siaka et notre chère maman Kanouya COUMARE, je tiens à travers ces quelques lignes vous témoigner de mon sincère remerciement pour l'accompagnement, la confiance et l'amour que vous avez manifesté à mon endroit. Je sais que vos prières et vos bénédictions nous accompagnent. Puisse l'éternel Dieu nous permettre de pérenniser ce lien si précieux de longue date et qu'il vous garde aussi longtemps auprès de nous en bonne santé.

**A la grande famille KONE**

En témoignage de mon amour, de mon profond respect et de ma reconnaissance.

**A mes cousins, cousines, neveux et nièces :** Grand merci

**A tous mes amis**

Jonas POUDIOUGO, Elam SOGOBA, Freddy A D POUNABA, Mamadou SISSOUMA, Moïse COULIBALY, Adama KONE, Alou DEMBELE, Paul DEMBELE, Sem SANOGO, Japhet SANOGO, Massa Ibrahima COULIBALY, Tom DEMBELE, Nathanel DEMBELE, Etienne DEMBELE, Barou SOGOBA, Emmanuel DIARRA, Amadou S TOURE (Dassa), Claude A DIARRA, Ousmane A TOURE, Dramane DIARRA, Bakary COULIBALY.

Vous qui m'avez assisté durant ces années de parcours en m'accompagnant dans les moments heureux ainsi que les moments difficiles de la vie. Soyez Bénis !

**A mes camarades de classe de Université Kankou Moussa :**

Le chemin fut long, rude avec des pics de stress, cependant durant ces moments, j'ai trouvé en chacun de vous un frère et une sœur recevez ma profonde considération.

**A toute la grande famille GBEEM (Groupe Biblique des Élèves et Étudiants du Mali) particulièrement celui de l'UKM.**

**A toute la communauté chrétienne de l'Eglise Evangélique Protestante de Niamakoro-socoura et celle de Koulouba**

**A la Direction et au corps professoral de l'université Kankou Moussa :**

Pour la qualité de l'enseignement que nous avons reçu.

**A tous les volontaires de nos études :** Pensées profondes et ma disponibilité absolue !

**A mes encadreurs du MRTC/DEAP :** Pour votre disponibilité et votre franche collaboration.

**A la famille MEDRU :**

A l'équipe de l'unité de chimiorésistance du MRTC/DEAP: Particulièrement aux Professeurs : Abdoulaye DJIMDE, Souleymane DAMA, Amadou Niangaly, Antoine DARA, aux Docteurs : Bakary FOFANA, Mamadou TEKETE, Dinkorma OUOLOGUEM, Aly KODIO, Amadou BAMADIO, Diagassan DOUMBIA, Bassirou DIAKITE, Hamidou NIANGALY, Bintou DIARRA , Aminatou KONE, Nouhoum DIALLO, Oumar Bila TRAORE, Nianwalou DARA, Fatoumata BALLO, Sékou SISSOKO, Bilaly TRAORE, Aliou TRAORE, Bakary SIDIBE, Aboubecrin HAIDARA, Adam GARANGO, Mohamed KONATE , Siaka GOITA, Fatalmoudou TANDINA, Moussa DJIMDE, Bouran SIDIBE, Adoulaye DOUMBIA, Cheick Papa Oumar SANGARE, Dr AMATIGUE Zeguimè, Ahmed KONATE, François DAO, Amadou Hamidou TOGO, Mohamed Lamine Alhousseini, Laurent DEMBELE, Mahamadou Daby CAMARA, Fanta SOGORE, Yacouba Nani BARRE, Fatoumata CISSE, Bakoroba DIARRA, Boi KONE, aux internes : Souleymane Babouya KONE, Djéneba DIALLO, Abdoul Karim SAMAKE,

Aux camarades thésards du MRTC/DEAP Merci !

**À tous ceux qui ont participé d'une manière ou d'une autre à ma formation**

**Que Dieu vous bénisse**

# HOMMAGE AUX MEMBRES DU JURY

**A notre Maître et Président du jury**

**M. Abdoulaye DJIMDE, PharmD, PhD**

- ✓ **Professeur titulaire de Parasitologie-Mycologie à la FAPH**
- ✓ **Directeur du MRTC Parasitologie**
- ✓ **Chef de l'Unité d'Epidémiologie Moléculaire et de la Chimiorésistance (MEDRU)**
- ✓ **Directeur du Programme DELGEME**
- ✓ **Membre de l'académie Africaine des sciences**
- ✓ **Membre de l'académie Malienne des sciences**

Cher maître, permettez-nous de vous témoigner notre satisfaction pour l'honneur et le privilège que vous nous avez accordé en acceptant de présider ce jury malgré vos multiples occupations. Nous avons admiré vos qualités humaines, scientifiques et pédagogiques, qui font de vous un maître apprécié et respecté de tous. Recevez ici cher maître l'expression de notre Reconnaissance et de notre profond respect.



**A notre Maître et Juge**

**M. Bakary Fofana, MD, PhD Candidat**

- ✓ **Attaché de recherche à la Faculté de Pharmacie**
- ✓ **Master en Recherche clinique**
- ✓ **Chercheur au MRTC Parasitologie**

Cher maître, vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail malgré vos multiples occupations. Votre simplicité, vos immenses qualités humaines, votre rigueur dans le travail bien fait font de vous un maître admirable par les étudiants.

**A notre Maître et Directeur de thèse**

**M. Abdoulaye Kassoum Koné,**

- ✓ **Maitre de Conférence Agrégé de Parasitologie-Mycologie à la Faculté de Médecine et d'odontostomatologie**
- ✓ **Responsable de l'Unité de Diagnostic des parasitoses au MRTC parasitologie**
- ✓ **Médecin-chercheur au MRTC Parasitologie**

Cher maître, c'est un grand honneur et un réel plaisir que vous nous faites en acceptant de diriger ce travail malgré vos multiples occupations. Votre rigueur et votre sens élevé du travail bien fait ont contribué à améliorer le contenu de cette thèse. Trouvez ici très cher maître, le témoignage de notre reconnaissance et de notre profond respect.

**A notre Maître et Co-directeur de thèse**

**M. Souleymane DAMA, PharmD, PhD**

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

Cher maître, ce temps passé à vos côtés, nous avons beaucoup appris de vos valeurs humaines et scientifiques. Votre disponibilité, votre dévouement dans les labeurs nous ont été d'une grande aide. Nous ne saurions être assez reconnaissants pour tout l'intérêt et toute la considération que vous avez apporté à ce travail.

# LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

## **LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS :**

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**AQ** : Amodiaquine

**BB** : Bleu de Bromophénol

**BGN** : Bacille Gram Négatif

**CDC** : Center for Disease Control (Centre de contrôle des maladies)

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**CPS** : Chimio-prévention du Paludisme Saisonnier

**CQ** : Chloroquine

**DEAP** : Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires

**DELGEME** : Developing Excellence in Leadership and genetics Training for Malaria Elimination in Sub-Saharan Africa

**DHA** : Dihydroartémisinine

**DHFR** : DiHydroFolate Réductase

**DHPS** : DiHydroPtéroate Synthétase

**EDTA** : Ethyl-Diamine Trichloro-Acétate

**EIPM** : Enquête sur les Indicateurs du Paludisme au Mali

**FAPH** : Faculté de Pharmacie

**FDC** : Fixed Dose Combination (Combinaison à dose fixe)

**FMOS** : Faculté de Médecine et d'Odonto-Stomatologie

**GBEEM** : Groupe Biblique des Élèves et Etudiants du Mali

**HRP** : Histidine Rich Protein (Protéine riche en histidine)

**ICAM** : InterCellular Adhesion Molecule (Molécule d'adhésion intercellulaire)

**IFN** : Interferon

**IRB** : Institutional Review Board (Conseil d'examen institutionnel)

**Kg** : kilogramme

**LDH** : Lactate Déshydrogénase

**MDR** : Multi drug resistance (Résistance aux médicaments multiples)

**MEDRU** : Molecular Epidemiology and Drug Resistance Unit (Unité d'Épidémiologie Moléculaire et de Chimiorésistance)

**mg** : milligramme

**ml** : millilitre

**mmHg** : millimètre de mercure

**mmol** : millimole

**MRTC** : Malaria Research and Training Center (Centre de recherche et de formation sur le paludisme)

**MSF** : Médecins Sans Frontières

**NGS** : Next Generation Sequencing (Séquençage de nouvelle génération)

**NK** : Natural killer

**nM** : Nano-molaire

**NO** : Monoxyde d'azote

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**P** : Probabilité de se tromper ou d'avoir tort en rejetant l'hypothèse nulle

**PABA** : Acide Para-Amino-Benzoïque

**PB** : Paire de Bases

**PCR** : Polymerase Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne)

**PNB** : Produit National Brut

**PNLP** : Programme National de Lutte contre le Paludisme

**QBC** : Quantitative Buffy Coat

**QPCR** : PCR Quantitative

**RFLP** : Restriction Fragment Length Polymorphism (Polymorphisme de longueur des fragments de restriction)

**RPMI** : Roswell Park Memorial Institute (Institut commémoratif Roswell Park)

**RSA** : Ring Stage survival Assay (Essai de survie au stade de l'anneau)

**SBS** : Sequencing By Synthesis (Séquençage par synthèse)

**SP** : Sulfadoxine-Pyriméthamine

**TBE** : Tris Borate EDTA

**Evaluation des marqueurs moléculaires de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'amodiaquine après sept cycles de chimio-prévention du paludisme saisonnier dans le district sanitaire de Moïssala, Tchad**

---

**TDR** : Test de Diagnostic Rapide

**TNF** : Tumor Necrosis Factor (Facteur de nécrose tumorale)

**UI** : Unité Internationale

**UKM** : Université Kankou Moussa

**USTTB** : Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako

**UV** : ultraviolet

**µl** : microlitre

# TABLE DES MATIERES



## Table des matières :

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>1</b>   | <b>INTRODUCTION :</b> .....  | <b>2</b>  |
| <b>2</b>   | <b>OBJECTIFS</b> .....   | <b>6</b>  |
| <b>2.1</b> | <b>Objectif général :</b> .....  | <b>6</b>  |
| <b>2.2</b> | <b>Objectifs spécifiques :</b> .....   | <b>6</b>  |
| <b>3</b>   | <b>GENERALITES :</b> .....   | <b>8</b>  |
| <b>3.1</b> | <b>Généralités sur le paludisme :</b> .....  | <b>8</b>  |
| 3.1.1      | Historique : .....   | 8         |
| 3.1.2      | Physiopathologie : .....   | 11        |
| 3.1.3      | Formes cliniques du paludisme : .....  | 13        |
| 3.1.4      | Diagnostic biologique : .....  | 16        |
| <b>3.2</b> | <b>Les antipaludiques :</b> .....  | <b>18</b> |
| 3.2.1      | Classification des antipaludiques : .....  | 18        |
| <b>3.3</b> | <b>Généralités sur la résistance de <i>Plasmodium falciparum</i> à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'amodiaquine :</b> ..... | <b>21</b> |
| 3.3.1      | La résistance aux antimétabolites: .....   | 22        |
| 3.3.2      | La résistance aux amino-4-quinoléines : .....  | 22        |
| 3.3.3      | Méthodes d'évaluation de la chimiorésistance : .....   | 24        |
| <b>4</b>   | <b>METHODOLOGIE :</b> .....  | <b>35</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Cadre d'étude</b> .....   | <b>35</b> |
| 4.1.1      | Description du site d'étude : .....  | 35        |
| 4.1.2      | Choix de sites d'étude : .....   | 37        |
| <b>4.2</b> | <b>Type d'étude :</b> .....  | <b>37</b> |
| <b>4.3</b> | <b>Période d'étude :</b> .....   | <b>37</b> |
| <b>4.4</b> | <b>Population d'étude :</b> .....  | <b>37</b> |
| <b>4.5</b> | <b>Echantillonnage :</b> .....   | <b>37</b> |
| <b>4.6</b> | <b>Analyse moléculaire :</b> .....   | <b>38</b> |
| 4.6.1      | Extraction de l'ADN <i>plasmodial</i> .....  | 39        |
| <b>4.7</b> | <b>Amplification de l'ADN <i>plasmodial</i> :</b> .....  | <b>40</b> |
| 4.7.1      | Matériel .....   | 40        |
| 4.7.2      | Préparation des réactifs de PCR .....  | 40        |
| 4.7.3      | Réactifs pour la révélation .....  | 41        |
| 4.7.4      | Technique d'amplification .....  | 41        |
| <b>4.8</b> | <b>Gestion et analyse des données :</b> .....  | <b>49</b> |
| <b>4.9</b> | <b>Considérations éthiques et déontologiques :</b> .....   | <b>50</b> |
| <b>5</b>   | <b>RESULTATS</b> .....   | <b>52</b> |
| <b>6</b>   | <b>COMMENTAIRES ET DISCUSSION :</b> .....  | <b>58</b> |
| <b>7</b>   | <b>CONCLUSION :</b> .....  | <b>63</b> |
| <b>8</b>   | <b>RECOMMANDATIONS :</b> .....   | <b>65</b> |
| <b>9</b>   | <b>REFERENCES</b> .....  | <b>67</b> |
| <b>10</b>  | <b>ANNEXES :</b> .....   | <b>74</b> |

# LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

## Liste des tableaux :

|  |    |
|--|----|
| Tableau I: Zones d'étude .....   | 35 |
| Tableau II: Mélange réactionnel de la première amplification de Pfdhfr des codons 51 et 59 pour un volume final de 25 µl ..... | 42 |
| Tableau III: Programme de la première amplification de Pfdhfr .....  | 43 |
| Tableau IV: Mélange réactionnel de la deuxième amplification des codons 51 et 59 de Pfdhfr pour un volume final de 25 µl ..... | 44 |
| Tableau V: Programme de la deuxième amplification des codons 51 et 59 de Pfdhfr .....  | 44 |
| Tableau VI: Composition du Mélange réactionnel des codons 51 et 59 de Pfdhfr de la digestion .....                             | 45 |
| Tableau VII: Prévalence des allèles des gènes Pfdhfr et Pfdhps en 2012 .....   | 52 |
| Tableau VIII: Prévalence des triples, quadruples et quintuples mutants des gènes Pfdhfr/Pfdhps en 2012 .....                   | 52 |
| Tableau IX: Prévalence des allèles des gènes PfcrtK76T et Pfmdr1N86Y en 2012 .....   | 53 |
| Tableau X: Prévalence des allèles des gènes Pfdhfr et Pfdhps en 2021 .....   | 53 |
| Tableau XI: Prévalence des triples, quadruples et quintuples mutants des gènes Pfdhfr/Pfdhps en 2021 .....                     | 54 |
| Tableau XII: Prévalence des allèles des gènes PfcrtK76T et Pfmdr1N86Y en 2021 .....  | 54 |
| Tableau XIII: Comparaison des prévalences de triples mutants, quadruples mutants et quintuples mutants de 2012 à 2021 .....    | 55 |
| Tableau XIV: : Comparaison des prévalences des allèles mutants Pfcrt76T et Pfmdr1 86Y de 2012 à 2021 .....                     | 56 |

## Liste des figures :

|   |    |
|---|----|
| Figure 1: : Cycle de développement plasmodium et particulièrement de Plasmodium falciparum .....  | 11 |
| Figure 2: Principe de la méthode de séquençage de Sanger .....  | 31 |
| Figure 3 : Localisation des districts sanitaires de Bouna et Moïssala et des centres de santé concernés par l'étude d'estimation des proportions de mutations associées à la résistance à la SP et AQ ..... | 36 |

# INTRODUCTION

## **1 INTRODUCTION :**

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

A ce jour cinq espèces sont inféodées à l'homme. Il s'agit de :

*Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), *Plasmodium malariae* (*P. malariae*), *Plasmodium vivax* (*P. vivax*), *Plasmodium ovale* (*P. ovale*) et *Plasmodium knowlesi* (*P. knowlesi*) [4].

Depuis des années, des approches diverses et variées ont été mises en place par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et les programmes nationaux de lutte contre le paludisme (PNLP) pour le contrôle, la prévention, l'élimination et même l'éradication de la maladie [5]. Malgré ces efforts, le paludisme reste encore un problème majeur de santé publique. En Effet statistiquement l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) dans son dernier rapport sur le paludisme en 2022 [6], fait état de 247 millions de cas de paludisme/an dans le monde avec 627 000 décès ; dont les 95% surviennent en Afrique, parmi lesquels les enfants de moins de 5 ans représentaient 80% [6]. Cette hausse brutale serait due à la perturbation des services sanitaires pendant la pandémie de Covid-19. Cependant les pays et leurs partenaires ont adopté des stratégies pour éviter le pire [7,8].

Les populations vulnérables sont les enfants de moins de cinq ans [5], les femmes enceintes et les sujets non immuns [9] ; avec des complications diverses de l'anémie palustre aux troubles de l'apprentissage et des incapacités consécutives aux lésions cérébrales [10].

Comme la plupart des pays de l'Afrique subsaharienne en plus du fardeau humain, le paludisme est un lourd fardeau pour l'économie nationale par la réduction du Produit National Brut (PNB) cela s'explique par les jours de travail perdus par les personnes actives et entrave la scolarité des enfants et le développement social [11].

Au Tchad, le paludisme constitue la première cause de mortalité et de morbidité[9], statistiquement il a été constaté en 2022, 1 055 819 de cas confirmés et 2 955 décès, le paludisme représentait la principale cause de consultations (42%), d'hospitalisations (39%) et de décès (32%) dans les formations sanitaires [12]. Il est endémique avec un pic saisonnier et une distribution inégale de cas du Nord au Sud. Le Sud du pays, dont le district sanitaire de Moïssala fait partie, est très touché [13].

### **La chimioprévention du paludisme :**

A l'instar des autres pays d'Afrique, le Tchad a adopté en 2012 la politique nationale de la chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS). La chimioprévention du paludisme saisonnier est définie comme « l'administration intermittente d'un traitement complet par la combinaison Sulfadoxine-Pyriméthamine plus Amodiaquine (SP + AQ) pendant la saison de haute transmission du paludisme pour éviter la maladie, l'objectif étant de maintenir des concentrations thérapeutiques de médicament antipaludique dans le sang pendant la période où le risque de contracter le paludisme est plus élevé [14].

Des études antérieures réalisées en Afrique de l'Ouest particulièrement au Mali et au Burkina Faso ont montré que la CPS sélectionnait les marqueurs moléculaires de résistance de *Plasmodium falciparum* aux médicaments de la CPS par Maiga H et *al.*, en 2016 [15] , Zongo I et *al.*, en 2015 [16].

Des études menées par Traore B et *al.*, en 2020 [17] et Issa Mahamat S. et *al.*, en 2018 [18] ont montré que des données existent sur la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance de *Plasmodium falciparum* à la SP + AQ au Tchad mais aucune étude n'a été réalisée pour mesurer l'impact de la pression de la CPS sur les marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* à la SP + AQ.

Cette étude a été initiée par l'organisation non gouvernementale, Médecins sans frontière (MSF) dans le but d'évaluer l'impact de dix années de cycles de la CPS sur la sélection des marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* à la combinaison SP + AQ à Moïssala, Tchad.

### **L'hypothèse de recherche**

La pression exercée pendant dix années de la CPS sélectionne les marqueurs moléculaires de résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine et l'amodiaquine.

### **Question de recherche :**

Quelle est la prévalence des marqueurs moléculaires de *P. falciparum* à la Sulfadoxine-pyriméthamine et à l'amodiaquine après dix années de la CPS à Moïssala, Tchad ?



# OBJECTIFS

## 2 OBJECTIFS

### 2.1 Objectif général :

Evaluer l'impact de dix années de la CPS sur la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* à la combinaison sulfadoxine-pyriméthamine et à l'amodiaquine.

### 2.2 Objectifs spécifiques :

- 1 Déterminer la prévalence des allèles des gènes (*Pfdhfr*N51I, *Pfdfr*C59R, *Pfdhfr*S108N, *Pfdhps*A437G, *Pfdhps*K540E) associés à la résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine en 2012 et 2021 ;
- 2 Déterminer la prévalence des allèles des gènes (*Pfcr*tK76T et *Pfmdr*1N86Y) associés à la résistance à l'amodiaquine en 2012 et 2021 ;
- 3 Comparer les prévalences de 2012 avec celles de 2021.

# GENERALITES

### 3 GENERALITES :

#### 3.1 Généralités sur le paludisme :

##### 3.1.1 Historique :

L'origine géographique du paludisme est controversée et se perd dans la nuit des temps. Le paludisme fait partie des plus vieilles affections de l'humanité et des indices suggèrent que l'homme préhistorique en était atteint [19]. On trouve ainsi dans les anciens manuscrits chinois et égyptiens, de même que dans la littérature grecque et romaine, des témoignages relatifs aux fièvres épidémiques dont les signes ressemblent beaucoup à ceux du paludisme [20]. C'est en 1717 que Giovanni Lancisi attribua cette maladie aux émanations nocives des marais, d'où le nom malaria, de l'italien « malera » ou air vicié ; en 1880 pour que Docteur Alphonse Laveran, un médecin de l'armée française, témoin de l'exflagellation d'un gamétocyte mâle lors de l'observation au microscope d'échantillons de sang des patients impaludés [21]. Deux ans plus tard, l'hypothèse de la transmission du paludisme par le moustique était déjà émise. Cette hypothèse fut confirmée en 1897 par Ronald Ross qui fit la découverte de l'importance du moustique dans le cycle de vie du paludisme aviaire et décrivit des kystes paludéens dans les parois de l'estomac d'anophèles [22]. En 1898, Grassi décrivit le cycle de transmission complet du parasite et prouva que le paludisme observé chez l'homme est transmis par des moustiques du genre Anophèles [23]. La nomenclature concernant les différents stades de développement du parasite sera publiée en 1900 par Schaudinn [24]. L'agent pathogène a d'abord été nommé *Oscillare malariae* puis *Heamoeba malaria* [25]. Successivement, furent mis en évidence les espèces *P. vivax* [26], *P. malariae*, *P. falciparum* et *P. ovale* [27](4). Les dégâts causés par le paludisme pendant la première guerre mondiale vont susciter la recherche et la mise à disposition des nouvelles molécules antipaludiques telles que les dérivés des amino-8-quinoleines, des amino-9-acridines et des amino-4-quinoleines dont la plus représentative est la chloroquine [28]. La chloroquine sera ensuite largement utilisée aussi bien en traitement curatif qu'en chimio prophylaxie jusqu'à ce que l'OMS ait lancé en 1950 un programme d'éradication du paludisme à l'échelle mondiale : le monde unit contre le paludisme. C'est ainsi qu'il y a eu le développement de nombreux antipaludiques de synthèses dont les plus connus sont l'amodiaquine, la pyriméthamine, le cycloguanil et le proguani [29]. L'activité antiplasmodique de l'extrait d'*Artemisia annua* dont le principal principe actif est l'artémisinine qui a été identifié en 1971 [29].

### **3.1.1.1 Cycle biologique :**

A partir de 1948 toutes les phases du cycle de développement du parasite ont été élucidées. Ce cycle biologique de *Plasmodium* peut être caractérisé par deux phases (Figure 1) : une phase de multiplication asexuée ou schizogonie (comportant une phase hépatique ou exo érythrocytaire et une phase érythrocytaire) se déroulant chez l'homme et une phase de différenciation sexuée suivie d'une multiplication asexuée, appelée sporogonie, se déroule chez le moustique [30].

### **3.1.1.2 Phase hépatique ou phase exo érythrocytaire :**

Cette phase hépatique commence avec la pique de l'anophèle femelle. Le moustique infecté inocule la salive contenant des sporozoïtes dans les tissus sous-cutanés de l'hôte humain. Une fois inoculés, les sporozoïtes traversent les couches vasculaires endothéliales pour se retrouver dans la circulation sanguine (Figure 1) [31]. Les sporozoïtes entament les phases du cycle dans un état dit de compétence d'infectivité [31]. Les sporozoïtes du sang périphérique atteignent les cellules hépatiques. Une fois dans le foie, les sporozoïtes pénètrent dans l'hépatocyte par invagination et deviennent des trophozoïtes puis des cryptozoïtes qui forment à leur tour des schizontes hépatiques. La vacuole parasitophore se forme. Cette vacuole a pour rôle de protéger le parasite du cytosol de l'hôte [22,32][33]. Le parasite se multiplie par division cellulaire pendant 7 à 20 jours selon les espèces, ce qui aboutit à la production de dizaines de milliers de mérozoïtes.

Après 6 à 10 jours (cas de *P. falciparum*) d'infestation, les hépatocytes éclatent et larguent leur contenu dans le sang périphérique [32]. Au niveau hépatique, *P. ovale* et *P. vivax* peuvent donner la forme dormante appelée hypnozoïtes. Les mérozoïtes hépatiques atteignent alors la circulation sanguine sous forme de paquets de parasites de taille et de forme variable. L'enveloppe de ces paquets appelée « mérosome » ou « extrusome » est celle d'un hépatocyte nécrosé grâce à laquelle le parasite mime une cellule vivante afin d'être reconnue comme cellule du soi pour échapper aux cellules NATURAL KILLER (NK) [34]. La libération de mérozoïtes hépatocytaires est un processus synchrone dans le paludisme à *P. falciparum* [35]. Les mérozoïtes libérés après éclatement des corps bleus vont infecter les globules rouges pour entamer la phase érythrocytaire.

### **3.1.1.3 La phase érythrocytaire :**

Les mérozoïtes issus des schizontes hépatiques ayant gagné la circulation sanguine infectent chacun un érythrocyte grâce au processus parasitaire actif (Figure 1) c'est l'invasion [35,36] après l'invasion de l'hématie, il se différencie au sein de la vacuole parasitophore en anneau puis en trophozoïte qui digère le contenu de la cellule hôte (Figure 1). Les trophozoïtes se transforment en schizontes. A maturation, les schizontes entraînent la lyse des hématies parasitées avec libération de l'hémozoïne (pigment malarique) qui est à l'origine des accès de fièvre. Les mérozoïtes libérés après éclatement de l'hématie envahissent de nouveaux globules rouges et bouclent ainsi le cycle schizogonique érythrocytaire. Après l'invasion des globules rouges, certains mérozoïtes se différencient en gamétocytes mâles ou femelles. Cette étape, appelée gamétocytogenèse se déroule en parallèle du cycle érythrocytaire [37].

### **3.1.1.4 Sporogonie ou multiplication sexuée (chez le moustique) :**

L'anophèle femelle, au cours d'un repas sanguin (chez un sujet infecté) nécessaire pour la maturation de ses œufs, ingère des trophozoïtes, des schizontes et des gamétocytes. Dans l'estomac du moustique, les trophozoïtes et les schizontes sont digérés tandis que les gamétocytes se transforment en gamètes mâles et femelles (Figure 1). Les gamètes mâles et femelles fusionnent pour former d'abord un zygote (immobile), qui devient un œuf mobile, l'ookinète [20]. L'ookinète migre dans le tube digestif du moustique et se fixe à la paroi de l'estomac. Dans les heures qui suivent sa formation, l'ookinète diploïde devient à la suite d'une méiose [38] un oocyste haploïde, immobile et arrondi. A l'intérieur de l'oocyste, surviennent des divisions mitotiques successives qui aboutissent à la formation de milliers de sporozoïtes haploïdes [39]. L'oocyste mature est appelé sporocyste. Le sporocyste va éclater et libérer les sporozoïtes qui regagnent avec prédilection les glandes salivaires de l'anophèle. Après maturation des sporozoïtes par l'expression différenciée de certains gènes, le moustique devient alors infectieux et reste dans cet état pendant environ un mois [40]. La reproduction sexuée assure donc un brassage génétique important des parasites. La durée du cycle sporogonique varie de 10 à 40 jours et est fonction de la température et l'espèce *plasmidiale*. D'une manière générale, en dessous de 16°C, le cycle sporogonique ne peut s'accomplir. Les conditions optimales sont, une température de 20°C à 30°C et une humidité d'au moins 60% [41].

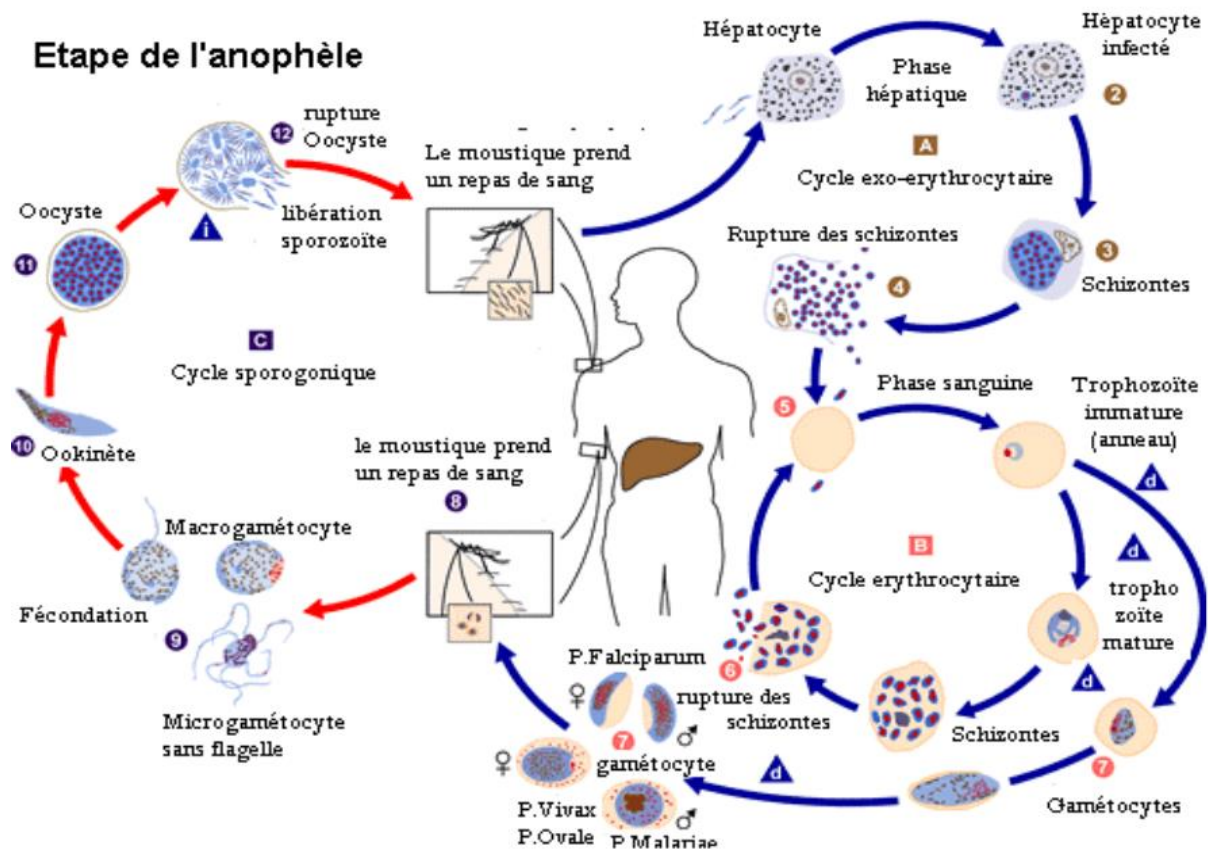


Figure 1: : Cycle de développement du Plasmodium

Source : [Memoire Online - Contribution à l'étude de la qualité des comprimés d'Artésunate en coblister douze mois après la peremption - Glory Panzu Mavwanda](https://www.memoireonline.com/)  
<https://www.memoireonline.com/>.

### 3.1.2 Physiopathologie :

La physiopathologie du paludisme est encore imparfaitement connue mais les répercussions de l'infection palustre sur certains organes ont été bien décrites.

**Phase Sanguine :** la phase de schizogonie érythrocytaire entraîne une hémolyse responsable d'une anémie d'installation progressive grave chez les jeunes enfants et les femmes enceintes. L'hémoglobine libérée par l'hémolyse provoque une surcharge rénale et est partiellement transformée en bilirubine dans le foie. L'excès est éliminé dans les urines entraînant une hémoglobinurie. D'autre part l'utilisation de l'hémoglobine par le parasite amène la précipitation dans son cytoplasme de granules de pigment (hémozoïnes), dont la libération lors de l'éclatement du globule rouge est en partie responsable de la fièvre. Le pigment, accumulé dans le cytoplasme

du schizonte, est relargué dans le plasma lors de la libération des mérozoïtes. Il est alors phagocyté par les monocytes-macrophages et les polynucléaires neutrophiles (leucocytes mélanifères). Les plaquettes sont séquestrées par des mécanismes, encore mal précisés, probablement immunologiques. La conséquence en est une thrombopénie, perturbation biologique fréquemment et précocement observée au cours d'un accès palustre.

**Au niveau de la rate :** la rate est hypertrophique, molle et congestive. Sa couleur caractéristique, rouge foncé, parfois brune est due à l'accumulation du pigment internalisé par les phagocytes. L'augmentation de volume est provoquée par l'hypertrophie de la pulpe blanche (lymphocytes, cellules réticulaires, macrophages). L'activité phagocytaire concerne les globules rouges parasités, les débris cellulaires, le pigment parasitaire. Histologiquement, au cours du paludisme viscéral évolutif, la rate est énorme, fibro-congestive et foncée à la coupe avec une hyperplasie lymphoïde et histiocytaire mais les parasites y sont rares.

**Au niveau du foie :** La schizogonie exo-érythrocytaire ne produit aucune lésion inflammatoire. La destruction par les schizontes d'un certain nombre de cellules parenchymateuses passe inaperçue. On observe une hyperplasie des cellules de Küpffer chargées de la phagocytose des débris cellulaires et de l'hémozoïne, associée à des dépôts d'hemosidérine. Ultérieurement les dépôts de pigment envahissent les espaces portes au sein d'infiltrats lympho-histiocytaires.

**Physiopathologie de l'accès grave :** le neuropaludisme (accès pernicleux = « cérébral malaria » des anglo-saxons) et l'anémie, sont les complications majeures du paludisme à *P. falciparum*. Basées au départ sur des études anatomopathologiques post-mortem réalisées chez des patients décédés de neuropaludisme, de très nombreuses recherches ont été développées pour élucider sa physiopathologie. Plusieurs théories, probablement complémentaires sont actuellement retenues, notamment la séquestration d'hématies parasitées par des formes matures de *Plasmodium*, adhérant aux cellules endothéliales des micro-vaisseaux et l'intervention de cytokines ou autres médiateurs.

**Séquestration :** Les formes âgées de *P. falciparum* (trophozoïtes âgés, schizontes) disparaissent de la circulation sanguine périphérique et sont séquestrées dans les capillaires des organes profonds (cerveau mais aussi reins, poumons ...). Cette séquestration est, au moins en partie, due à des phénomènes d'adhésion cellulaire (cytoadhérence) entre les globules rouges parasités et les cellules endothéliales de ces capillaires. Cette cytoadhérence est sous la dépendance d'interactions entre



des récepteurs moléculaires présents à la surface des globules rouges parasités (PfEMP1) et des récepteurs spécifiques des cellules endothéliales (ICAM-1). Cette séquestration peut aussi être accentuée par des blocages dans les capillaires due à une déformabilité moindre des hématies parasitées et à la formation de « rosettes » : agrégats constitués d'une hématie parasitée à laquelle adhèrent plusieurs hématies non parasitées.

**Cytokines et autres médiateurs :** des cytokines pro-inflammatoires (TNF-a, IFN-g, IL1, IL6...) et différents produits métaboliques (NO, acide lactique ...) sont produits, en cascade, au cours du neuropaludisme. Leur action se conjugue probablement au phénomène de blocage circulatoire conséquence de la séquestration. Les modèles expérimentaux étant forcément réducteurs, il est difficile de savoir comment s'articulent, *in vivo*, ces différents mécanismes. Ce qui a été décrit au niveau du cerveau est probablement vrai au niveau des autres organes (reins, poumon, placenta...) expliquant la défaillance multiviscérale parfois observée lors d'un accès grave. Il apparaît évident maintenant que la physiopathologie du paludisme grave est probablement beaucoup plus complexe qu'on a pu le penser initialement [42,43].

### **3.1.3 Formes cliniques du paludisme :**

Les manifestations cliniques du paludisme sont exclusivement liées à la schizogonie endo-érythrocytaire. Les principaux signes que sont la fièvre, l'anémie et le sub-ictère sont dus à l'éclatement des hématies et des rosaces avec libération du pigment malarique. L'expression et la gravité de la maladie dépendent du parasite (espèce *plasmodiale* et densité parasitaire) et de l'état de prémunition de l'individu. Selon les cas, il est possible de distinguer cinq formes cliniques [44] :

#### **3.1.3.1 Paludisme de primo invasion :**

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

Les manifestations sont :

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

### **3.1.3.2 Accès de reviviscence :**

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

Frissons, chaleur, sueurs, accès se répétant tous les 2 jours : fièvre tierce maligne à *P. falciparum* ou bénigne à *P. vivax*, *P. ovale*, ou tous les 3 jours : fièvre quarte bénigne à *P. malariae*. Ces accès s'accompagnent d'une splénomégalie. La splénomégalie est le témoin de la prémunition, sa présence et son degré chez les enfants de moins de 10 ans constituent un des marqueurs du niveau d'endémie palustre (indice splénique).

### **3.1.3.3 Paludisme viscéral évolutif (PVE) :**

Les principales caractéristiques du PVE sont :

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

### **3.1.3.4 Fièvre Bilieuse Hémoglobinurique (FBH) :**

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

Bien connue avant 1950, en rapport avec les prises de quinine dans une zone d'endémie à *P. falciparum*, la FBH a resurgi au cours de ces dernières années. Les cas sont toujours observés avec la quinine, mais aussi avec des molécules de structure chimique apparentée (halofantrine) [45] [46].

L'importance d'une polymédication associant 2 ou plusieurs antipaludiques est soulignée. La FBH associe :

- fièvre élevée + hémoglobinurie macroscopique (urines couleur porto) due à une hémolyse intravasculaire aiguë,
- choc, anémie aiguë, insuffisance rénale aiguë (IRA),
- pronostic sévère : mortalité de l'ordre de 20%, morbidité élevée : 90% des patients présentent une IRA nécessitant dans un cas sur deux une épuration extra-rénale,
- diagnostic différentiel avec l'hémolyse aiguë associée à une forte parasitémie au cours d'un paludisme grave et avec l'hémolyse médicamenteuse (amino-8-quinoléines, sulfamides et sulfones en cas de déficit en G6PD) [46].

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

### **3.1.3.5 Neuropaludisme et les autres formes graves et compliquées :**

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

Les critères de paludisme grave ont été actualisés par l'OMS en 2000. Ces critères sont les mêmes chez l'adulte et chez l'enfant[47].

- Neuropaludisme (score de Glasgow < 9, score de Blantyre  $\leq 2$ ),
- Convulsions répétées (> 1/ 24 heures),
- Prostration,
- Syndrome de détresse respiratoire,
- Ictère (clinique),
- Acidose métabolique (bicarbonates plasmatiques < 15 mmol/L),

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

### **3.1.4 Diagnostic biologique :**

**3.1.4.1 Diagnostic biologique direct :** C'est le diagnostic d'urgence qui repose sur la mise en évidence des formes érythrocytaires de Plasmodium sur un prélèvement de sang périphérique. Le résultat doit être obtenu dans un délai maximal de 2 heures avec un contact direct entre le médecin prescripteur et le biologiste [48].

**3.1.4.1.1 Le prélèvement :** Le plus simple consiste à recueillir, sur une lame porte-objet de microscope, une ou deux gouttes de sang par piqûre au doigt (face latérale de l'annulaire), au lobe de l'oreille ou au talon (chez l'enfant) et de confectionner immédiatement les étalements (frottis minces et/ou goutte épaisse).

#### **3.1.4.1.2 Techniques de référence :**

##### **➤ Goutte épaisse**

Cette technique très ancienne réalise une micro-concentration et reste la méthode de référence. Elle consiste à examiner environ 10 µl de sang après hémolyse des globules rouges et coloration selon la méthode de Giemsa. C'est une excellente technique mais de réalisation un peu délicate et qui nécessite une bonne expérience pour la lecture. Le diagnostic d'espèce n'est pas toujours possible. Le nombre de parasites pour 200 leucocytes doit être compté la formule utiliser est (Nombre de parasites comptés x 8000 leucocytes/µl et le tout divisé par le nombre de leucocytes comptés) [49].

$$\text{Nombre de trophozoïtes}(\mu\text{l}) = \frac{\text{Nombre de trophozoïte comptés} \times 8000}{\text{Nombre leucocytes comptés}}$$

➤ **Frottis mince**

La lame est colorée selon la méthode de May-Grünwald-Giemsa ou par du Giemsa après fixation à l'alcool. Les parasites, colorés en rouge (noyau) et bleu (cytoplasme) sont retrouvés à l'intérieur des globules rouges (pas d'hémolyse dans cette technique). Le diagnostic positif et le diagnostic d'espèce s'en trouvent facilités. C'est une technique qui permet l'étude morphologique des hématozoaires. Le diagnostic différentiel entre les espèces *plasmodiales* reste toujours un défi même pour un lecteur qualifié. La sensibilité du frottis mince est entre 100-200 hématies parasitées/ $\mu\text{l}$  ; 50 parasites par  $\mu\text{l}$ .

**Autres techniques :** Pour tenter de simplifier et d'améliorer le diagnostic biologique du paludisme, d'autres techniques ont été développées dont les tests rapides par immunochromatographie sur bandelette, le quantitative Buffy Coat (QBC) et les techniques moléculaires [49].

➤ **Tests de diagnostic rapide immunochromatographique :**

Le principe de ces tests est la détection de protéines spécifiques de *Plasmodium* (antigènes HRP-2 ou enzymes pLDH, aldolase), en chromatographie sur un support solide. Certains de ces tests permettent maintenant d'affirmer un diagnostic positif (présence de *Plasmodium*) et d'orienter le diagnostic d'espèce : *P. falciparum* et/ou autre espèce. Ces tests rapides, très simples d'utilisation et conditionnés en emballages unitaires, sont très pratiques et ont une bonne sensibilité (surtout pour *P. falciparum* s'ils détectent l'antigène HRP-2) mais ne permettent pas de mesurer la parasitémie et restent positifs, pour certains, plusieurs jours après la disparition des plasmodies du sang. L'utilisation de ces tests rapides dans les algorithmes de prise en charge du paludisme est recommandée lorsque l'examen microscopique n'est pas possible [50].

➤ **QBC Malaria® (Quantitative Buffy Coat) :**

Il s'agit d'une technique basée sur une centrifugation en tube capillaire et un marquage non spécifique des parasites par un fluorochrome (acridine orange). Il s'agit d'une technique de concentration, très facile à maîtriser, donnant une sensibilité équivalente à celle de la goutte

épaisse (mais ne permettant pas un diagnostic d'espèce). En revanche elle nécessite un matériel spécifique. Sa commercialisation a été arrêtée [49].

➤ **Place de la biologie moléculaire :**

Des techniques de biologie moléculaire ont été développées pour le diagnostic du paludisme. Leur sensibilité est excellente et elles permettent un diagnostic d'espèce. Elles peuvent donc constituer une aide au diagnostic dans certains cas difficiles. Mais leur temps de réalisation et leur coût ne permettent pas, à l'heure actuelle, de les envisager en diagnostic de routine.

**3.1.4.2 Diagnostic biologique indirect :**

La sérologie n'est d'aucun apport pour le diagnostic d'urgence de l'accès palustre ; une sérologie positive signe uniquement un contact préalable avec le parasite. Les indications de la sérologie sont [51]:

- le diagnostic rétrospectif d'un accès palustre (par exemple, patient traité en zone d'endémie sans argument biologique de certitude) ;
- le diagnostic d'un paludisme viscéral évolutif ou d'une splénomégalie palustre hyperréactive ;
- le contrôle des donneurs de sang ou d'organes à risque ;
- les enquêtes épidémiologiques.

**3.2 Les antipaludiques :**

**3.2.1 Classification des antipaludiques :**

**3.2.1.1 Schizonticides érythrocytaires :**

- **Amino-4-quinoléines** : chloroquine (Nivaquine®), amodiaquine (Flavoquine®), pipéraquline. - Amino-alcools : quinine (Quinimax®, Surquina®, Quinine Lafranc®), méfloquine (Lariam®), halofantrine (Halfan®), luméfantine.
- **Sesquiterpènes** : artémisinine et ses dérivés : dihydroartémisinine, artémether, artésunate.
- **Antimétabolites** : antifoliques : sulfadoxine, dapsonne, antifoliniques : proguanil (Paludrine®), pyriméthamine (Malocide®), antibiotiques : cyclines (Doxypalu®, Granudoxy®Gé, Vibraveineuse®), clindamycine (Dalacine®, Zindacine®),
- **Analogues de l'ubiquinone** : atovaquone.

**3.2.1.2 Schizonticides intra hépatiques :**

- **Amino 8 quinoléines** : primaquine (Primaquine®), tafenoquine (Krintafel®, Arakoda®).

- **Antimétabolites** : proguanil, cyclines.

### 3.2.1.3 Gamétocytocides :

- **Amino 8 quinoléines** : primaquine (Primaquine®), tafenoquine (Krintafel®, Arakoda®).

### 3.2.1.4 Associations et combinaisons d'antipaludiques à effet synergique schizonticide :

L'action synergique schizonticide de plusieurs molécules permet d'augmenter l'efficacité des médicaments antimalariques et d'obtenir une protection mutuelle des produits contre l'acquisition de résistance des plasmodies, essentiellement de *P. falciparum*. Certaines de ces associations sont déjà anciennes : - Quinine + tétracyclines en zones de quininorésistance (forêts d'Asie du sud-est et Amazonie); - Sulfadoxine + pyriméthamine (Fansidar®) - Méfloquine + sulfadoxine + pyriméthamine (Fansimef®, utilisé en Asie du sud-est), - Chloroquine + proguanil (Savarine®, utilisée en chimioprophylaxie seulement), Les « nouveaux » antimalariques sont tous associés, au moins en bithérapie : - soit en associations libres (2 sortes de comprimés) : artésunate + sulfadoxine/pyriméthamine (Arsudar®), artésunate + amodiaquine (Arsucam®), artésunate + méfloquine (Artequin®) ; - soit en associations fixes (FDC : fixed dose combination) : atovaquone + proguanil (Malarone®), artémether + luméfántrine (Coartem®/Riamet®), artésunate + amodiaquine (AS/AQ®, Coarsucam®), artésunate + méfloquine (AS/MQ®).

#### 3.2.1.4.1 Sulfadoxine-Pyriméthamine et Amodiaquine :

##### ➤ La Sulfadoxine-Pyriméthamine (Fansidar®)

- **Structure de la pyriméthamine et de la Sulfadoxine :**

Le Fansidar® est composé d'association de sulfadoxine et de pyriméthamine. La sulfadoxine est un antifolique qui inhibe la *dihydroptéroate synthétase (DHPS)* en compétissant avec son substrat, l'acide para-amino-benzoïque (PABA). Elle a une action schizonticide. Son rôle essentiel est la potentialisation des antifoliniques, notamment la pyriméthamine. Cette dernière qui a une action lente, inhibe la *dihydrofolate réductase (DHFR)*. La pyriméthamine est active sur les stades pré-érythrocytaires et altère la sporogonie chez l'Anophèle, ce qui diminue la transmission.

L'action antiplasmodiale est potentialisée par l'association avec la sulfadoxine, sulfamide à action prolongée. Les deux agissent en synergie comme inhibiteurs enzymatiques pour bloquer la synthèse des acides aminés du parasite aux différents niveaux de synthèse précisément elle empêche le parasite de polymériser l'hème en un produit insoluble appelé hémozoïne ce qui conduit à la mort du parasite. Ils sont actifs sur les formes asexuées des 4 espèces *plasmodiales*.

La pyriméthamine administrée en raison de 25 mg/kg poids corporel par voie orale est bien absorbée, les concentrations plasmatiques d'environ 200 mg/ml sont atteintes entre 2 et 6 heures. Environ 80-90% sont liés aux protéines plasmatiques. Elle est principalement métabolisée dans le foie et lentement excrétée par voie urinaire, avec une demi-vie d'élimination d'environ 4 jours. Une étude menée sur les sujets impaludés, à la suite d'une administration de 1g et 50 mg de sulfadoxine et pyriméthamine respectivement, les concentrations se situant entre 300 et 600 µg/L (= mg/ml) ont été observées pendant au moins deux semaines et l'élimination pendant au moins un mois après la prise d'où l'administration en dose unique. Les effets secondaires tels que des réactions cutanées (syndrome de Lyell), la toxicité hématologique (leucopénie, agranulocytose, thrombopénie...), des cas de toxicité hépatique avec ictère, toxicité respiratoire, ont été signalés.

Etant des inhibiteurs de l'acide folinique, la prudence s'impose chez les malades avec carence en cet acide ou traités aux médicaments susceptibles de diminuer l'acide folinique, le cas entre autres des anti-convulsivants, du triméthoprime... Aussi chez les enfants il pourrait provoquer l'ictère à la suite de l'immaturité de leur système enzymatique. A dose élevée, la combinaison peut être mortelle, avec des symptômes tels que céphalées, anorexie, nausées, vomissements, excitation et éventuellement convulsions et anomalies hématologiques. Dans de tels cas l'administration de diazépam peut aider à maîtriser les convulsions. L'injection de l'acide folinique peut corriger la dyscrasie sanguine, mais dans tous les cas il faut faire vomir le malade et procéder le plus rapidement à un lavage de l'estomac [52].

La SP se présente sous forme de comprimés dosés à 500 mg de sulfadoxine et 25 mg de pyriméthamine. La posologie dépend du poids de l'enfant. On donne ¼ de comprimé aux enfants pesant moins de 5 kg, ½ comprimé aux enfants à partir de 5 kg [53].

La plupart des nourrissons pèsent plus de 5 kg, mais il arrive que ce ne soit pas le cas dans les zones où sévit la malnutrition. Il est donc utile de peser les enfants pour déterminer la dose correcte de SP à administrer.

➤ **Amodiaquine :**

Elle a une structure et une action antipaludique semblable à celle de la chloroquine. Tout comme la chloroquine, elle possède des propriétés antipyrétiques et anti-inflammatoires. Cependant elle est active sur certaines souches chloroquinorésistantes.



L'Amodiaquine est absorbée dans le tractus gastro-intestinal, transformée en un métabolite actif la deséthylamodiaquine. Les effets secondaires hépatiques et une grande incidence d'agranulocytose, ont été rapportés. Administrée à une grande dose, il a été rapporté qu'elle peut provoquer des effets dont la syncope, la spasticité et des convulsions. Les études ont montré que l'association amodiaquine et sulfadoxine-pyriméthamine aboutissait à de meilleurs résultats cliniques et parasitologiques que ceux obtenus lors des administrations séparées. L'amodiaquine, possède un effet fébrifuge plus rapide que la sulfadoxine-pyriméthamine, son action contre la parasitémie est identique à celle de sulfadoxine-pyriméthamine du moins jusqu'au 7ème jour. En association elles agissent en synergie, la sulfadoxine-pyriméthamine prolonge cette action par sa longue demi-vie.

Cette combinaison offre une bonne efficacité et elle est bien tolérée. Aussi étant donné que le mode d'action d'amodiaquine est semblable à celui de la chloroquine, la résistance croisée partielle avec la chloroquine fait craindre que la durée de validité thérapeutique de l'association amodiaquine-sulfadoxine-pyriméthamine ne soit réduite à une courte période. L'association doit être utilisée comme solution transitoire pour retarder la résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine là où elle est encore efficace. Comprimés dosés à 200 mg. Le traitement de l'accès palustre consiste en une prise de 25 mg/kg d'amodiaquine base soit 10 mg/kg le premier jour, 10 mg/kg le deuxième jour et 5 mg/kg le troisième jour. Les effets secondaires sont généralement des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales, de la diarrhée, du prurit, une hépatite médicamenteuse toxique et l'agranulocytose [54].

### **3.3 Généralités sur la résistance de *Plasmodium falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'amodiaquine :**

**Définition de la chimiorésistance :** L'OMS a défini la chimiorésistance comme l'aptitude d'un microorganisme à survivre ou à se reproduire 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. La résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques est un phénomène réel sur tous les continents. Plusieurs études ont été menées pour expliquer le mécanisme de la résistance.

Un parasite résistant est celui qui présente une ou plusieurs mutation(s) génétique(s) au niveau de son ADN (selon les médicaments) et qui survit à des concentrations normalement létales pour ce

parasite. Ces mutations génétiques sont des anomalies qui se produisent lors de la réplication de l'ADN chromosomique ou mitochondrial du parasite.

### 3.3.1 La résistance aux antimétabolites: (Sulfadoxine-Pyriméthamine) [55].

Le gène de la résistance du *P. falciparum* à la sulfadoxine est situé sur le chromosome 5.

Les mutations ponctuelles au niveau du gène *Dhps* (*dihydroptéroate synthétase*), sont les bases moléculaires de la résistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine 58. Les substitutions de Sérine-Phénylalanine en position 436, Alanine-Thréonine/Sérine en position 613, Alanine-Glycine en position 437 et Lysine-Acide glutamique en position 540 ont été impliquées dans la *résistance in vitro* du *P. falciparum* à la sulfadoxine. Le rôle de la mutation Alanine-Glycine en position 437 sur *Dhps* dans la résistance *in vitro* à la sulfadoxine a été confirmé par la technique de transfection. Le gène de la résistance du *P. falciparum* à la pyriméthamine est situé sur le chromosome 4. Des mutations en position 51, 59 et 108 par substitution respectivement de l'Asparagine par l'Isoleucine, la Cystéine par l'Arginine et la Sérine par l'Asparagine seraient à l'origine de la résistance à la pyriméthamine *in vitro*. La mutation I164L à elle seule confère au parasite la résistance à la pyriméthamine.

Le rôle des mutations *Dhps* et *Dhfr* dans la résistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine *in vivo* n'est pas encore établi avec certitude malgré les données *in vitro*. Cependant certains auteurs ont trouvé une relation entre les échecs thérapeutiques et le génotype quintuple mutant 64. La résistance *in vitro* au cycloguanil est due à une mutation Sérine-Thréonine en position 108 associée à une Alanine-Valine en position 16 tandis que la mutation Isoleucine-Leucine en position 164 a été retrouvée chez les souches à la fois résistantes à la pyriméthamine et au cycloguanil.

### 3.3.2 La résistance aux amino-4-quinoléines : (Chloroquine et Amodiaquine) [56]

#### 3.3.2.1 La résistance à la chloroquine :

Certaines études de terrain ont trouvé une association entre les mutations *Pfmdr1* et la résistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine [56,57]. Une étude menée depuis les années 2000 a montré que le *Pfcr*, un gène à 13 exons, a été identifié près de cg2 sur le chromosome 7. Ce gène code pour *Pfcr*, une protéine transmembranaire présente dans les vacuoles digestives des parasites du paludisme. Des ensembles de mutations ponctuelles dans *Pfcr* ont été associés à la résistance à

la chloroquine *in vitro* dans des lignées de laboratoire de *P. falciparum* d'Afrique, d'Amérique du Sud et d'Asie du Sud-Est. Une mutation, la substitution de la *thréonine* (T) à la *lysine* (K) en position 76 (K76T), était présente dans tous les isolats résistants et absente chez tous les isolats sensibles testés *in vitro*. De plus, des expériences de transformation génétique avec des plasmides exprimant des formes mutantes de *Pfcr* ont conféré une résistance à la chloroquine à trois clones différents sensibles à la chloroquine. Ces études ont mis en évidence le rôle clé de la mutation *Pfcr* T76 dans l'obtention d'une résistance *in vitro* à la chloroquine. Les auteurs s'accordent à reconnaître que la caractéristique commune des parasites résistants est une altération de l'accumulation de la CQ dans la vacuole digestive. Lorsqu'un parasite est résistant, il y a un efflux rapide de l'antipaludique de sa vacuole digestive, ce qui lui permet de survivre. Ces défauts d'accumulation du médicament seraient dus à une altération des gradients de pH et/ou de la perméabilité de la membrane. Selon Wunsch la résistance à la CQ repose sur une stimulation de l'échange  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Ils ont pu démontrer que la CQ stimule mieux l'échange  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  chez les parasites sensibles ce qui accroît le transport du médicament [58]. Cependant, le contraire se produit chez les parasites résistants. Deux mécanismes majeurs ont été évoqués dans la diminution de la susceptibilité de *P. falciparum* à la chloroquine :

- L'accès restreint de la chloroquine à sa cible, l'hème, rendu insoluble par la diminution du pH dans la vacuole digestive consécutive aux changements du transport des ions via la protéine mutée *Pfcr* ;
- Une expulsion directe de la chloroquine à partir de la vacuole digestive via la protéine mutée *Pfcr*, résultant d'une augmentation d'affinité pour ce transporteur de la chloroquine. Le rôle de pompage attribué au *Pfcr* pourrait aussi compter pour la divergence observée occasionnellement entre les mutations et la susceptibilité à la chloroquine. Dans ce cas, le parasite module sa réponse à la chloroquine en modifiant son niveau de production du *Pfcr*, au moins dans le système de remplacement allélique récemment développé pour les analyses fonctionnelles fines du gène *Pfcr*.

### **3.3.2.2 La résistance à l'amodiaquine :**

L'amodiaquine est un amino-4-quinoléine comme la chloroquine. De nos nombreux essais cliniques ont montré l'efficacité de cette molécule dans les régions où la chloroquine-résistance est élevée. Cependant dans certaines zones l'amodiaquine utilisée en monothérapie s'avère moins

efficace. Une résistance croisée partielle avec la chloroquine a été également décrite. Jusqu'à nos jours il n'y a pas de marqueur moléculaire pour l'amodiaquine. On pense que des variations alléliques sur le *Pfprt* et sur le *Pfmdr1* auraient une relation avec une élévation de résistance à l'amodiaquine [55].

### **3.3.3 Méthodes d'évaluation de la chimiorésistance :**

L'évaluation de la chimiorésistance a été standardisée par l'OMS pour l'espèce *P. falciparum* [59].

Il s'agit des épreuves d'évaluation *in vitro* et *in vivo*.

#### **3.3.3.1 Test *in vivo* :**

Il consiste à administrer, à un sujet porteur de *P. falciparum*, la dose ordinairement recommandée de l'antipaludique à tester et à contrôler la parasitémie au bout d'un temps donné [54]. L'évaluation de l'efficacité des schémas thérapeutiques se fait directement avec les tests de l'OMS. Ces tests de l'OMS proposent des suivis de 28 jours pour la chloroquine et l'amodiaquine, 42 jours pour la sulfadoxine-pyriméthamine, l'artémether-luméfántrine (Coartem®) et le test de 63 jours pour la méfloquine. Le test standard de l'OMS de 28 jours consiste à soigner les patients atteints d'infection mono spécifique à *P. falciparum* avec contrôle de la parasitémie aux jours 1, 2, 3, 7, 14, 21 et 28.

#### **Avantages du test *in vivo* :**

- Adhésion facile de la population au protocole d'étude car elle y trouve un intérêt médical immédiat ;
- Réalisation plus simple et aisée (même par un agent de santé de base) ;
- Détermination du niveau de la résistance afin d'adopter un schéma thérapeutique adéquat.

#### **Inconvénients du test *in vivo* :**

- Interprétation difficile des résultats liée aux troubles du métabolisme du médicament, au niveau immunitaire du malade et aux troubles d'absorption du médicament ;
- Longue durée pour le diagnostic de la résistance [60].

#### **3.3.3.2 Tests *in vitro* :**

Ils consistent à mesurer l'inhibition de la maturation en schizontes des parasites isolés chez un sujet, en présence des doses croissantes d'un antipaludique donné. Après le macro-test mis au point

par l'OMS et vite abandonné, ce sont les micro-tests qui sont actuellement utilisés. On distingue [61] :

### **3.3.3.3 Tests optiques :**

Le micro-test OMS et le semi-micro-test de Le Bras ont été mis au point à la fin des années 70 : ils sont basés sur la capacité des doses croissantes d'antipaludiques testés à empêcher la maturation des trophozoïtes de *P. falciparum* en schizontes, le prélèvement sanguin est mis en culture dans du milieu RPMI (Rostewell Park Memorial Institute) et incubé à 37°C, en présence de CO<sub>2</sub> et de O<sub>2</sub>, pendant 24 à 48 heures. Les résultats s'expriment en concentration minimale inhibitrice (CMI) pour le micro-test et en concentration inhibitrice 50% (CI<sub>50</sub>) ou 90% (CI<sub>90</sub>) pour le semi-micro-test. Parmi les micro-tests nous avons le micro-test isotopique de Desjardins et le semi-micro-test de Le bras et Deloron qui sont appelés des tests isotopiques. Ces tests sont des modifications, respectivement, du micro-test OMS et du semimicro test optique. Après 18 heures d'incubation, à chaque cupule un radio-isotope est ajouté (hypo xanthine tritiée). La croissance des parasites est révélée par l'incorporation du radio-isotope dans le noyau des parasites. La mesure de la radioactivité se fait dans un compteur à scintillation. Les résultats sont donnés en coup par minute et l'activité du médicament est exprimée en CI<sub>50</sub> ou en CI<sub>90</sub>.

### **3.3.3.4 Micro-test de Mark II :**

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

### **3.3.3.5 Test de Makler :**

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

### 3.3.3.6 Test de Ring Stage Survival Assay (RSA) :

Le RSA<sub>0-3h</sub> fournit une plateforme pour la caractérisation moléculaire de la résistance à l'artémisinine. Le test RSA<sub>0-3h</sub> peut être mis en œuvre lorsque la surveillance de la résistance à l'artémisinine est nécessaire.

#### - Le test de RSA *in vitro* :

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

#### - Le test de RSA *ex vivo* :

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

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

#### ✓ Avantages des tests *in vitro* :

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

#### ✓ Inconvénients des tests *in vitro* :

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

### 3.3.3.7 Tests moléculaires :

#### 3.3.3.7.1 PCR conventionnelle ou classique :

Ce sont des techniques qui permettent d'évaluer les mutations du parasite. Il consiste en une amplification exponentielle de l'ADN *plasmodial* en présence d'une enzyme (Taq polymérase),

d'amorces spécifiques et d'un milieu tampon. La révélation se fait par électrophorèse de l'ADN amplifié sur gel d'agarose [62].

### **Technique :**

Cette technique décrite en 1985 par Kary Mullis permet une amplification enzymatique *in vitro* de l'ADN initial. Elle nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent de l'ADN à amplifier. Connaissant ces deux séquences, on synthétisera deux oligonucléotides qui ont deux fonctions. La première étant la reconnaissance de la partie de l'ADN à amplifier et la deuxième, servant d'amorces à la Taq polymérase [63].

Des cycles successifs sont entrepris, chaque cycle comprenant :

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

Cette technique a eu de l'ampleur avec la découverte d'une ADN polymérase non inactivée par la chaleur dans les années 1995 par Wickenhauser C, son utilisation dans l'amplification *in vitro*. Il s'agit de la Taq polymérase (isolée d'une bactérie thermophile adaptée à la vie dans des sources d'eau chaude ("*thermus aquaticus*")).

Avec la Taq polymérase on peut effectuer un nouveau cycle (dissociation, Association des amorces, réplification de l'ADN) sans avoir à ajouter chaque fois de l'enzyme. Ces réactions sont maintenant automatisées grâce à des thermocycleurs programmables en température et en temps [64].

Dans la première génération des tests PCR, dite "PCR Classique" ou "PCR en point final", les produits d'amplification PCR sont analysés au stade terminal du processus analytique. Le contenu des tubes contenant le milieu réactionnel et l'ADN matrice sont déposés sur un gel d'agarose. Si la séquence d'ADN cible a été amplifiée, la quantité d'ADN copiée est en quantité suffisante pour être visualisée, après migration des molécules d'ADN dans un champ électrique, sous la forme d'une

fluorescence UV. Cette approche ne permet toutefois d'obtenir que des résultats qualitatifs (réponse présence /absence de la séquence cible).

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

#### **3.3.3.7.2 PCR quantitative :**

La PCR quantitative (ou qPCR), est une méthode particulière de réaction en chaîne par polymérase permettant de mesurer la quantité initiale d'ADN. En réalité, la PCR quantitative mesure le nombre d'amplicon (portion d'ADN définie par un couple d'amorces). À chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN total ou d'amplicon est mesurée grâce à un marqueur fluorescent. L'obtention de la cinétique complète de la réaction de polymérisation permet d'obtenir une quantification absolue de la quantité initiale d'ADN cible, ce qui était très difficile à obtenir sans biais en PCR conventionnelle.

#### **Principe :**

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

#### **Techniques :**

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



en temps réel peut calculer l'efficacité E de la réaction. Plus souvent, une PCR en temps réel sur une série de dilution avec une quantité d'ADN initiale connue permet de calculer l'efficacité de la réaction. Les Ct sont placés sur un graphe en échelle logarithmique et l'équation de la régression linéaire passant par ces points donne l'efficacité (c'est le coefficient directeur). Grâce à l'extraordinaire puissance de la technique d'amplification de l'ADN par PCR, il est possible aujourd'hui d'établir un profil génétique à partir de quantités infimes d'ADN.

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

### **3.3.3.7.3 Séquençage :**

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

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

#### **3.3.3.7.3.1 Méthode de Sanger :**

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

(dATP, dTTP, dGTP, dCTP), monomères utilisés par la polymérase et d'un analogue didésoxyribonucléotides (ddNTP) qui joue le rôle de terminateur de chaîne [65]. Dans le didésoxyribonucléotide (ddNTP), le remplacement du groupement 3'OH par un 3'H empêche la formation d'une liaison phosphodiester du côté 3'. Ces nucléotides modifiés peuvent toutefois être incorporés par l'ADN polymérase car ils possèdent un côté 5'-triphosphate normal. Les règles d'appariement A-T et G-C sont respectées lors de l'incorporation des ddNTP. Ainsi le ddNTP sera incorporé lorsqu'on trouvera en regard un T sur le brin matrice. Du fait de l'incorporation spécifique de l'analogie par la polymérase, on obtient un mélange de fragments qui se terminent sélectivement aux positions correspondant au nucléotide choisi. Le principe de la méthode de séquençage est illustré sur la figure 2 : On effectue ainsi quatre réactions en parallèle, chacune avec l'un des quatre ddNTP et l'on sépare les fragments obtenus par électrophorèse. Afin de pouvoir identifier les fragments d'ADN synthétisés par la polymérase et en particulier pour pouvoir les distinguer de l'ADN matrice, on les marque avec un traceur fluorescent. Celui-ci est accroché à l'une de ses deux extrémités, soit en 5', sur l'amorce de séquençage, soit en 3' sur le didésoxyribonucléotide terminateur.

**SCHEMA DE STRUCTURE EN IMAGE :**

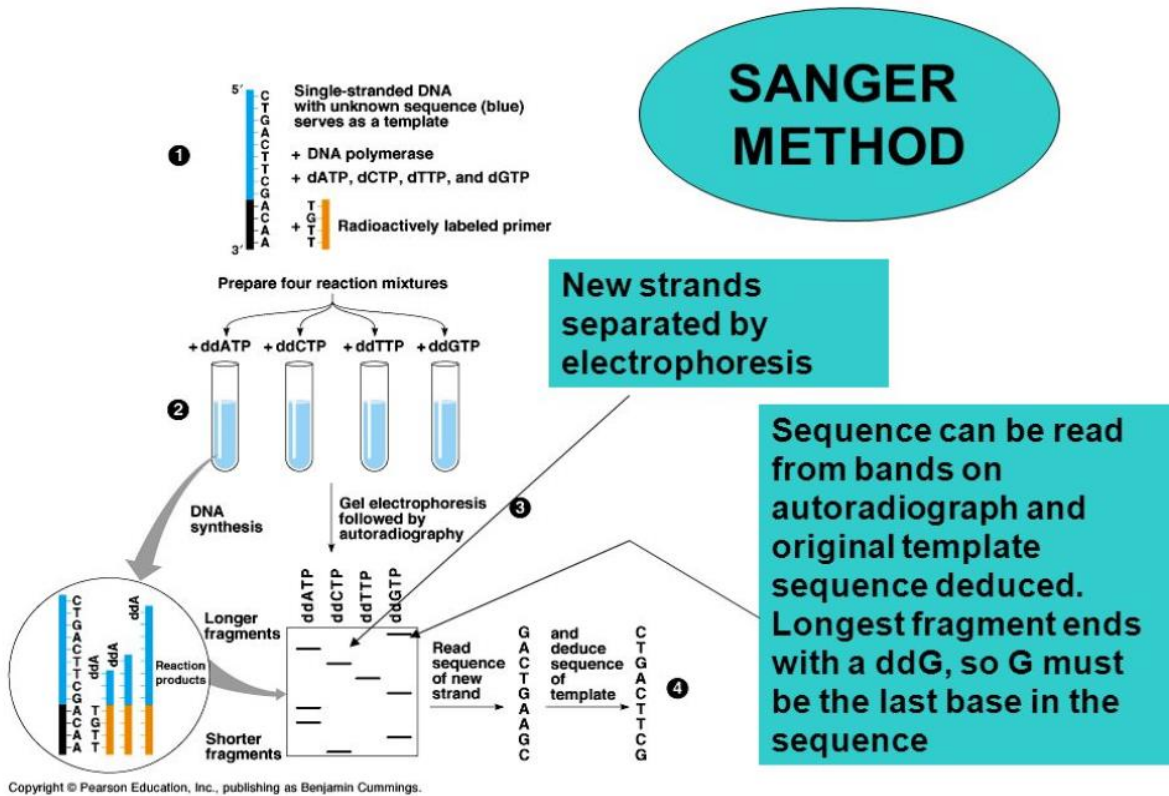


Figure 2: Principe de la méthode de séquençage de Sanger

Source : [La méthode de séquençage génétique de Sanger - Online Biology Notes](#)

Les séquenceurs automatiques modernes utilisent un système de détection *in situ* pendant l'électrophorèse. Le faisceau d'un laser émettant dans la bande d'absorption du fluorophore traverse le gel (Figure : 2).

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

Dans des conditions favorables, cette technique permet de lire jusqu'à 1000 nucléotides par fragment séquencé. En routine, la moyenne est de l'ordre 500 à 800 nucléotides par expérience. Deux méthodologies cohabitent actuellement, reposant sur l'utilisation d'un fluorophore unique ou bien sur celle de quatre traceurs fluorescents possédant des spectres d'émission distincts. Dans le premier cas, les quatre mélanges correspondant à chacun des quatre ddNTP sont déposés sur des

puits distincts du gel. L'analyse se fait sur la migration comparée des fragments dans les quatre pistes résultantes. Dans l'autre système, on utilise un fluorophore différent dans chacune des quatre réactions de séquençage. Une solution consiste à utiliser des ddNTP modifiés chacun par un traceur spécifique. Après avoir effectué les quatre réactions de polymérisation, on les mélange et on dépose dans le même puits sur le gel. La reconnaissance des nucléotides se fait alors sur la base des propriétés d'émission du traceur qui passe devant le faisceau laser, au moyen de filtres colorés sélectifs.

L'analyse est alors effectuée sur une seule piste du gel. La technique à quatre fluorophores est un peu plus onéreuse, car elle nécessite une chimie un peu plus diversifiée. En revanche, elle présente l'avantage d'être bien adaptée aux plus hauts débits, car plus d'échantillons peuvent être analysés sur le même gel. Dans les séquenceurs de dernière génération, le gel de polyacrylamide rectangulaire classique est remplacé par un capillaire réutilisable (le principe de la séparation et de la détection reste le même). Cette technique permet de réduire la durée des expériences de quelques heures à quelques dizaines de minutes et de minimiser le temps passé par l'opérateur pour sa préparation. Les modèles multi-capillaires les plus performants peuvent, en principe, traiter jusqu'à 1000 échantillons par jour, soit un débit théorique de 0,5 Mbases de séquence brute par jour et par machine.

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

#### **3.3.3.7.3.2 Séquençage nouvelle génération (Next Génération Sequencing, NGS)**

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

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

- SOLiD

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

Les technologies NGS présentent 3 étapes communes :

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

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

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

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

La technologie NGS peut être utilisée pour séquencer l'ADN de n'importe quel organisme, fournissant des informations précieuses en réponse à presque n'importe quelle question biologique. En tant que technologie hautement évolutive, le séquençage de l'ADN peut être appliqué à de petites régions ciblées ou à l'ensemble du génome grâce à une variété de méthodes [65].

### **3.3.3.7.3.3 Southern blot et Northern blot**

Les techniques de Southern blot et de northern blot sont des techniques d'hybridation des acides nucléiques. Elles sont réalisées après séparation des acides nucléiques par électrophorèse et transfert sur membrane de nitrocellulose ou de nylon. Dans ces deux types d'expériences, on cherche à repérer soit dans le génome soit dans les ARNm d'une cellule un fragment particulier, par exemple un gène donné. Pour cela, on utilise une sonde marquée d'ADN dont la séquence est complémentaire du fragment recherché. Le « repérage » se fait par hybridation entre la sonde marquée et le fragment d'ADN ou d'ARNm correspondant. Le marquage de la sonde avec un radioélément ou un fluorochrome permet de visualiser et de quantifier l'hybridation [66]

# METHODOLOGIE

## 4 METHODOLOGIE :

### 4.1 Cadre d'étude

#### 4.1.1 Description du site d'étude :

L'étude s'est déroulée dans la région de Mandoul, département de Barh Sara précisément à Moïssala qui est composé de 8 zones qui ont été utilisées comme site d'étude ; nous avons : Bekourou, Bekamba, Boukinaoua, Dembo, Gabian, Gon, Gonohong et Koldaga, au Tchad.

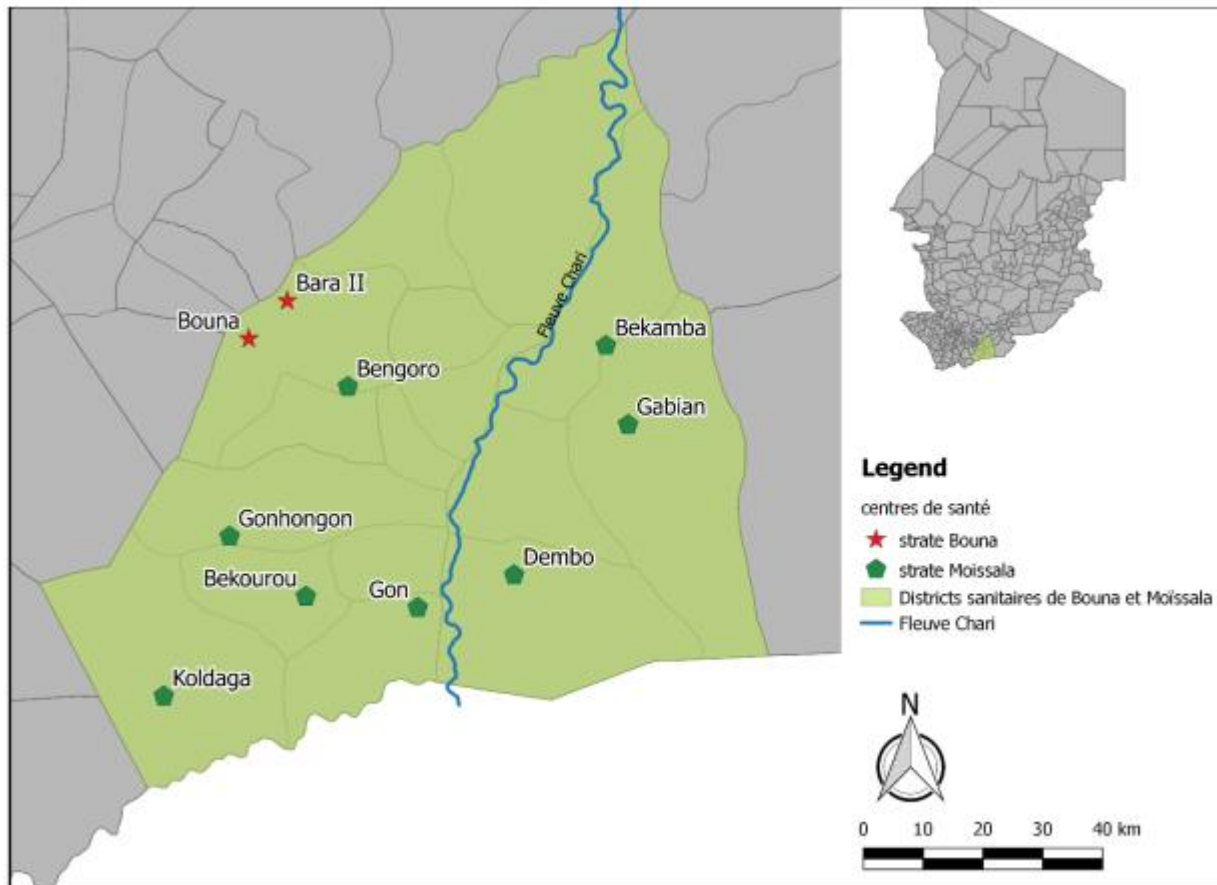
Les enfants résidant dans ces zones ont bénéficié de 7 (sept) campagnes de chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS).

L'équipe du Tchad était chargée de l'administration des médicaments du CPS aux volontaires et de leurs suivis. Les prélèvements sanguins ont été effectués chez les volontaires, les confettis récoltés ont servi à l'extraction de l'ADN plasmodial ensuite l'analyse des marqueurs moléculaires au MRTC/MEDRU.

Tableau I: Zones d'étude

| Différentes Zones | Sites d'étude |
|-------------------|---------------|
| Zone 1            | Bekourou      |
| Zone 2            | Bekamba       |
| Zone 3            | Boukinaoua    |
| Zone 4            | Dembo         |
| Zone 5            | Gabian        |
| Zone 6            | Gon           |
| Zone 7            | Gonohong      |
| Zone 8            | Koldaga       |

Evaluation des marqueurs moléculaires de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'amodiaquine après sept cycles de chimio-prévention du paludisme saisonnier dans le district sanitaire de Moïssala, Tchad



*Figure 3 : Localisation des districts sanitaires de Bouna et Moïssala et des centres de santé concernés par l'étude d'estimation des proportions de mutations associées à la résistance à la SP et AQ*

**Source :** [OpenStreetMap-Moissala-tchad](#)

Le Tchad est un pays principalement plat dont l'altitude moyenne atteint 550 mètres. Seul le nord et l'est du pays présentent des altitudes plus élevées, le point culminant étant le Mont Emi Koussi, un volcan qui est également, à 3 415 mètres, le plus haut sommet du Sahara.

Le pays associe deux grands types de climats : le nord et le centre sont des régions désertiques, tandis que le sud présente un climat plus tropical [13,67]



Les trois zones bioclimatiques qui déterminent trois profils ou faciès épidémiologiques du paludisme :

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

#### **4.1.2 Choix de sites d'étude :**

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

#### **4.2 Type d'étude :**

Il s'agissait d'une enquête nationale sur les indicateurs du paludisme au Tchad de 2012 à 2021 au cours de laquelle une étude descriptive transversale a été menée auprès des familles résidentes.

#### **4.3 Période d'étude :**

La collecte des échantillons a été faite en 2012 et 2021 par l'équipe du PNLP de Tchad et l'analyse moléculaire a été faite à Bamako/Mali au laboratoire de biologie moléculaire de l'unité d'épidémiologie moléculaire et de la chimiorésistance en 2022.

#### **4.4 Population d'étude :**

Des volontaires appartenant à différentes catégories démographiques (enfants de moins de 15ans) avec TDR (Test de Diagnostic Rapide) positif ont été inclus dans cette étude.

#### **4.5 Echantillonnage :**

Selon les objectifs de l'étude tels que décrits par l'Épicentre en collaboration avec Médecin sans frontière et PNLP-Tchad, pour une représentativité, un tirage aléatoire a permis d'obtenir au total

223 échantillons pour l'année 2012 et 249 échantillons pour l'année 2021 pour les analyses moléculaires des marqueurs de résistance à la SP et à l'AQ.

#### **4.6 Analyse moléculaire :**

Pour la réalisation des tests moléculaires, Epicentre et MSF se sont appuyés sur le laboratoire du Malaria Research and Training Centre (MRTC) de l'Université des Sciences des Techniques et de Technologies de Bamako (USTTB) au Mali. Ce laboratoire est celui qui a réalisé les analyses des marqueurs moléculaires de 223 échantillons de l'étude précédente en 2012.

#### **Raisons du choix de MEDRU pour les analyses :**

Le MEDRU (Molecular Epidemiology and Drug Resistance Unit) en français est une unité d'Épidémiologie Moléculaire et de Chimiorésistance. Cette unité a été choisie compte tenu de son expérience dans l'épidémiologie moléculaire, le diagnostic et l'évaluation de la chimiorésistance du paludisme.

#### **Lieu et déroulement de l'analyse**

L'analyse moléculaire a été effectuée dans le laboratoire de l'Unité d'Épidémiologie Moléculaire et de Chimiorésistance à Sotuba (abrégiée MEDRU en anglais) du Département d'Épidémiologie des Affections Parasitaires (DEAP) de la Faculté de Pharmacie (FAPH), de Médecine et Odontostomatologie (FMOS) de : Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB).

L'analyse moléculaire de l'année 2021 à laquelle j'ai participé a porté sur 249 échantillons.

Nous avons procédé à l'extraction, à l'amplification, à la migration, à la révélation par photographie aux rayons UV de l'ADN *plasmodial*, ensuite à l'interprétation des résultats obtenus. La Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) est la technique qui a été utilisée pour la recherche de mutation.

Le type de PCR que nous avons utilisé pour l'analyse moléculaire des échantillons étaient la RFLP-PCR [49]. Cette méthode nous a permis d'identifier les mutations sur les gènes de résistance à la sulfadoxine pyriméthamine (*Pfdhfr* : codons 51, 59 et 108 et *Pfdhps* : codon 437 et 540), à l'amodiaquine (*Pfprt* : codon 76 et *Pfmdr1* : codon 86).

#### 4.6.1 Extraction de l'ADN *plasmodial*

##### 4.6.1.1 Matériel et réactifs :

Blouse, paire de gants, paire de ciseaux, papier hygiénique, confettis, marqueur indélébile, racks, tubes Eppendorf, Becher, poubelle, micropipette (100, 200, 1000 µl), embouts (100, 200, 1000 µl), QIAamp DNA Mini Kit, hotte, plaque chauffante, vortex, Eau et alcool 70° pour nettoyage des ciseaux, congélateur.

##### 4.6.1.2 Mode opératoire :

L'extraction de l'ADN *plasmodial* a été faite à l'aide du Kit QIAGEN et la procédure est la suivante:

- ✓ Le découpage approximativement 3 mm<sup>2</sup> du papier buvard imprégné de sang, le transférer dans un microtube de 1,5ml, puis ajouter 180 µl de tampon ATL et incubé à 85°C pendant 10 minutes. Puis centrifuger brièvement.
- ✓ Puis nous avons ajouté 20 µl de Protéinase K, homogénéiser et incubé à 56°C sur une plaque chauffante pendant une heure. Puis centrifuger brièvement.
- ✓ Nous avons ajouté 200 µl de tampon AL puis homogénéiser et incubé à 70°C pendant 10 minutes. Centrifuger brièvement pour enlever les gouttes qui se trouvent à l'intérieur du couvercle du tube.
- ✓ Ensuite 200 µl d'éthanol (96-100%) a été ajouté à la solution précédant puis homogénéiser. Centrifuger brièvement pour enlever les gouttes qui se trouvent à l'intérieur du couvercle du tube.
- ✓ Cette solution obtenue a été transférer dans des colonnes QIAamp, fermer la colonne puis centrifuger à 8 000 rotations par minute (rpm) pendant 1 minute.
- ✓ Ensuite les colonnes ont été placées dans des nouveaux tubes de collection, suivi de l'ajout de 500 µl de tampon AW1, puis centrifuger à 8 000 rpm pendant 1 minute.
- ✓ Les colonnes ont été placées dans des nouveaux tubes de collection, précédé par l'ajout de 500 µl de tampon AW2, puis centrifuger à 14 000 rpm pendant 3 minutes.
- ✓ Cette dernière étape a été répétée pendant 1 minute.
- ✓ Ensuite nous avons placé les colonnes dans des tubes pré labellisés de 1,5 ml suivi de l'ajout de 150 µl de tampon AE, ces tubes ont été incubés à la température ambiante du labo pendant 1 minute puis centrifuger à 8 000 rpm pendant 1 minute.

- ✓ Enfin les échantillons étaient prêts pour l'amplification ou gardés à la température selon laquelle l'ADN ne perdra pas sa propriété.

#### 4.7 Amplification de l'ADN *plasmoidal* :

##### ✓ Principe

Le principe est basé sur l'amplification exponentielle *in vitro* de l'ADN en présence d'amorces spécifiques, de nucléotides, de Taq polymérase et d'un milieu tampon. Les mutations ponctuelles des gènes *Pfdhfr*, *Pfdhps*, *Pfcrt* et *Pfmdr1* sont ensuite déterminées par digestion avec des enzymes de restriction au niveau des codons 51, 59 et 108 pour *Pfdhfr*, 437 et 540 pour *Pfdhps*, 76 pour *Pfcrt* et 86 pour *Pfmdr1*.

##### ✓ Echantillon

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

#### 4.7.1 Matériel

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

#### 4.7.2 Préparation des réactifs de PCR

- dNTPs : Une solution de travail équimolaire des quatre dNTPs (désoxy Nucléotide Triphosphate) de 2 mM était préparée à partir d'un stock de 100mM (Cat # INV-10297018).
- **Solution tampon (PCR Buffer)** : Concentrée à 10X, elle était fournie par les compagnies commerciales avec le Mg<sup>2+</sup>.
- **Amorces**

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

- **Taq polymérase**

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

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

#### 4.7.3 Réactifs pour la révélation

- **Solution de migration, TBE (Tris Borate EDTA) :**

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

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

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

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

- **Colorant de migration :** Il s'agit du bleu de bromophénol (BB). Ce colorant était préparé en mesurant 35ml de glycérol, 15ml d'eau de-ionisée et 0,125g de bleu de bromophénol.
- **Gel de migration :** Il était préparé à partir de 2 g de poudre d'agarose dissout dans du TBE à 0,5X pour avoir un volume de 100ml. La solution est ensuite chauffée dans un four à micro-onde pendant 3 min, permettant ainsi la dissolution complète de l'agarose. Après le chauffage, on y ajoutait un colorant fluorescent, le Red Gel (3ul), puis le gel est coulé dans un moule de migration contenant les peignes. Au bout de quelques minutes ou quelques heures, le gel est prêt à être utilisé pour la migration.
- **Le Red Gel :** C'est un produit qui va s'intercaler entre les brins d'ADN et les rend fluorescent à la lumière ultra violette.
- **Marqueur de poids moléculaire :**

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

#### 4.7.4 Technique d'amplification

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

#### 4.7.4.1 Détermination des polymorphismes aux codons 51, 59 & 108 (*Pfdhfr* triple mutant)

##### ➤ Première amplification

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

- Identification des tubes de 200 µl conformément aux numéros des confettis à traiter ;
- Préparation du mélange réactionnel dans un tube de 1,5ml en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction ;
- Répartition dans chaque tube identifié un volume de 20 µl de mélange réactionnel ;
- Ajout de 5µl d'ADN extrait au Qiagen dans chaque tube correspondant ;
- Brève centrifugation des tubes ;
- Mise en place des tubes bien fermés dans le Thermocycleur pour l'amplification avec le programme approprié.

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

FR51-A : GCGCGCTAATAACTACACATTTA

FR51-B : CCCGGGCTCTTATATTTCAATTT

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

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

On ajoute dans chaque tube 5 µl d'ADN extrait qui donne un total de 25 µl comme volume final.

Tableau III: Programme de la première amplification de *Pfdhfr*

| Étapes                       | Températures | Temps  |
|------------------------------|--------------|--------|
| 1 Dénaturation initiale      | 95°C         | 5 min  |
| 2 Dénaturation               | 92°C         | 30 sec |
| 3 Hybridation                | 45°C         | 30 sec |
| 4 Elongation                 | 65°C         | 45 sec |
| 5 Nombre de cycle, 44 cycles |              |        |
| 6 Elongation finale          | 72°C         | 15 min |

➤ *Deuxième amplification des codons 51 et 59 du DHFR :*

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

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

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

FR51-D : CTAGGAAATAAAGGATATTACCATGG

FR59-D : ATTTTTCATATTTTGATTCATTCACATATGTTGTAAGTACTGTAC

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

| Réactifs                  | Concentration initiale | Concentration finale | Volume par réaction en µ |
|---------------------------|------------------------|----------------------|--------------------------|
| H2O                       | -                      | -                    | 11,875                   |
| Buffer/ Mgcl <sub>2</sub> | 5X/ 12,5 mM            | 1X/ 2,5 mM           | 5                        |
| dNTPs                     | 2 mM                   | 200 µM               | 2,5                      |
| FR51-D                    | 100 µM                 | 1 µM                 | 0,25                     |
| FR51-D                    | 100 µM                 | 1 µM                 | 0,25                     |
| Taq polymérase            | 5U / µl                | 0,025U               | 0,125                    |
| Volume Total              | -                      | -                    | 24 µl                    |

On ajoute dans chaque tube 1 µl du produit de la première amplification ce

qui fait un total de 25 µl

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

| Etapas                       | Températures | Temps  |
|------------------------------|--------------|--------|
| 1 Dénaturation initiale      | 95°C         | 5 min  |
| 2 Dénaturation               | 92°C         | 30 sec |
| 3 Hybridation                | 45°C         | 30 sec |
| 4 Elongation                 | 65°C         | 45 sec |
| 5 Nombre de cycle, 44 cycles |              |        |
| 6 Elongation finale          | 72°C         | 15 min |

➤ **Digestion enzymatique du produit de la 2ème amplification :**

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

- Inscrire sur les tubes les numéros des différents échantillons ;
- Préparer le milieu réactionnel pour la digestion (tableau VII) ;
- Distribuer dans chacun des tubes correspondants 15 µl de ce mélange réactionnel ; Ajouter 5 µl du produit de la deuxième amplification dans les tubes correspondant et les fermer ;
- Mettre en incubation dans un Thermocycleur ou un incubateur ou un bain-marie les tubes à 37 °C pour l'enzyme BsrGI pendant 30 min au minimum ou toute la nuit ;



**Evaluation des marqueurs moléculaires de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'amodiaquine après sept cycles de chimio-prévention du paludisme saisonnier dans le district sanitaire de Moïssala, Tchad**

- Enlever les tubes du Thermocycleur après le temps requis et les placer à + 4°C dans un réfrigérateur ;
- Procéder à la migration sur gel d'agarose à 2% dans une cuve à migration branché sur un générateur ;
- Prendre la photo du gel à travers un appareil à UV (Gel Doc® EZ Imager de BIO-RAD) et un écran de capture d'image.

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

| Réactifs   | Volume par réaction |
|--|---------------------|
| H2O  | 12,6 µl             |
| NE Buffer 2,1                                    | 2 µl                |
| EcoRI pour le codon 51 et BsrGI pour le codon 59 | 0,4 µl              |
| <b>Total</b>                                     | <b>15 µl</b>        |

Ajouter dans chaque tube 5 µl du produit de la deuxième amplification qui fait un total de 20 µl

**Interprétation et validation des résultats :**

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

Critères de validité du résultat de l'électrophorèse :

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

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

- 1) L'enzyme de restriction utilisée EcoRI coupe les souches de génotypes sauvages entre deux morceaux de 35 et 78 pb.
- 2) Les échantillons avec des bandes de même taille que le témoin sauvage correspond aux souches sauvages.
- 3) Les échantillons avec des bandes de même taille que le témoin résistant correspond aux souches mutées.

- 4) Un échantillon est considéré comme mixte quand il présente à la fois une bande correspondant au sauvage et une bande correspondant au mutant.

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

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

- **Couples d'amorces de la première PCR**

FR100-A : GGGGGGCAGTTACAACATATGTGA

FR100-B : GGGGGCACATTCATATGTACTATTT

- **Couples d'amorces de la deuxième PCR**

FR108-D : CTAATTCTAAAAATTACAAAATGT

FR108-D3 : TTTCTTTTCTAAAAATTCTTGATAAACAAGGGAACCTCTTA

#### **Digestion enzymatique du produit de la 2ème amplification :**

La procédure utilisée pour cette digestion est la même que celle utilisée pour la digestion des codons 51 et 59 de *Pfdhfr*. L'élément qui varie est l'enzyme : AluI. Interprétation et validation des résultats : Les critères de validité et de jugement pour la classification en génotype sauvage ou génotype mutée sont les mêmes que précédemment, l'élément qui change est le suivant : L'enzyme de restriction utilisée AluI coupe les souches de génotypes résistantes en 40 et 210 paires base (pb).

#### **4.7.4.2 Détermination des mutations ponctuelles aux codons 437 et 540 au niveau de *dihydroptéroate synthétase*.**

- **Première amplification** : La méthode de préparation du mélange réactionnel pour cette première étape est la même que celle utilisée pour la première PCR des *Pfdhfr* triples mutants, les éléments qui changent sont les amorces qui sont représentées ci-dessous et l'élongation qui se fait à 65°C pendant 45 sec [55].

#### **Couples d'amorces de la première amplification :**

- **Amorces spécifiques au codon 437 :**

Amorce sens PS400-A : GGGGTATTAAATGTTAATTATGATTCT

Amorce anti-sens PS400-B : GGGGTCACATTTAACAATTTTATT

- **Amorces spécifiques au codon 540 :**

Amorce sens PS500-A : GGGCCCAAACAAATTCTATAGTG

Amorce anti-sens PS500-B : GGCCGGTGGATACTCATCATATA

- **Deuxième amplification :**

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

**Couple d'amorces de la deuxième amplification :**

- **Amorces spécifiques au codon 437 :**

Amorce sens : PS400-D1 : TGTTC AAAGAATGTTTGAAATGA

Amorce anti-sens : PS400-D2 : CCATTCTTTTTGAAATAATTGTAAT

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

- **Amorces spécifiques au codon 540 :**

Amorce sens : PS500-D1 : GCGCGCGTTCTAATGCATAAAAGAGG

Amorce anti-sens : PS500-D2 CGGGTAAGAGTTTAATAGATTGATCAGCTTTCTTC

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

- **Digestion enzymatique du produit de la 2ème amplification :**

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

- **Interprétation et validation des résultats**

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

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

#### 4.7.4.3 Détermination du génotype des codons 86 et 76 au niveau de *Pfmdr1* et *Pfprt* respectivement [56,57].

##### ▪ Première amplification

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

##### Couples d'amorces de la première amplification :

- Amorces spécifiques au codon 86 de *Pfmdr1* :

Amorce sens MDR-1 : ATGGGGTAAAGAGAGAAAGA

Amorce anti-sens MDR-2 : AACGCAAGTAATACATAAAGTCA

- Amorces spécifiques au codon 76 de *Pfprt* :

Amorce sens P1 : CCGTTAATAATAAATACACGCAG

Amorce anti-sens P2 : CGGATGTTACAAAACCTATAGTTACC

##### ▪ Deuxième amplification :

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

##### Couple d'amorces de la deuxième amplification :

- Amorces spécifiques au codon 86 de *Pfmdr1* :

Amorce sens : MDR-3 : TGGTAACCTCAGTATCAAAGAA

Amorce anti-sens : MDR-4 : ATAAACCTAAAAAGGAACTGG

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

- **Amorces spécifiques au codon 76 de *Pfcr* :**

Amorce sens : D1 : TGTGCTCATGTGTTTAACTT

Amorce anti-sens : D2 : CAAACTATAGTTACCAATTTTG

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

- **Digestion enzymatique du produit de la 2ème amplification**

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

- **Interprétation et validation des résultats :**

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

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

#### **4.8 Gestion et analyse des données :**

L'analyse des données a été réalisée avec le logiciel stata version 14.2 (Stata Corporation).

L'analyse principale des données vise à estimer la proportion et les IC 95% des différentes mutations moléculaires. La comparaison entre les résultats de 2012 et de 2021 a été réalisée après avoir fusionné les deux bases de données. Les estimations ont été considérées statistiquement significative à une valeur inférieure à 0.05. ( $P < 0,05$ )

Nous avons calculé la prévalence et les pourcentages des mutations ponctuelles individuelles : *Pfdhfr* 51, 59, 108 et *Pfdhps* 437 et 540, *Pfcr76* et *Pfmdr1*. Dans un second temps, nous avons calculé la prévalence et les pourcentages des mutations groupées et la comparaison entre les résultats de 2012 et de 2021 a été réalisée après avoir fusionné les deux bases de données. Les

estimations ont été considérées significativement différentes à une valeur inférieure à 0.05 ( $P < 0,05$ ).

#### **4.9 Considérations éthiques et déontologiques :**

Le Protocol a été approuvé par le Comité National de Bioéthique du Tchad et du Comité d'éthique de MSF (MSF ERB). Le consentement éclairé était obtenu avant toute procédure liée à l'étude.

##### **Travaux personnels :**

Dès la réception des échantillons au sein de l'équipe du laboratoire, j'étais chargé de la vérification de la qualité et du nombre des confettis reçus. J'ai été impliqué à toutes les étapes de l'analyse énumérées ci-dessous :

- Extraction de l'ADN plasmodial par KIT de QIAGEN
- Préparation des réactifs de la PCR (PCR1, PCR2 et la DIGESTION)
- Amplification au thermocycleur
- Préparation du gel agarose
- Électrophorèse de l'ADN (migration sur gel d'agarose à 2% dans une cuve à migration branché sur un générateur)
- Prise de la photo du gel à travers un appareil à UV (Gel Doc® EZ Imager de BIO-RAD) et un écran de capture d'image.
- Lecture des images puis la sélection des échantillons qui ont donné des bandes selon la taille de l'allèle correspondant
- Puis l'interprétation des résultats à l'aide des images

# RESULTATS

## 5 RESULTATS

Dans cette section, nous exposons les prévalences des marqueurs moléculaires de la résistance de *P. falciparum* à la Sulfadoxine-Pyriméthamine et à l'Amodiaquine au Tchad.

**Tableau VII: Prévalence des allèles des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* en 2012**

| Allèles         | <i>Pfdhfr</i> N51I<br>n (%) | <i>Pfdfr</i> C59R<br>n (%) | <i>Pfdhfr</i> S108N<br>n (%) | <i>Pfdhps</i> A437G<br>n (%) | <i>Pfdhps</i> K540E<br>n (%) |
|-----------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <b>Sauvages</b> | 6 (2,69)                    | 7 (3,14)                   | 13 (5,83)                    | 211 (94,62)                  | 214 (95,96)                  |
| <b>Mutants</b>  | 217 (97,31)                 | 216 (96,86)                | 210(94,17)                   | 12 (5,38)                    | 9 (4,04)                     |
| <b>Total</b>    | 223 (100%)                  | 223 (100%)                 | 223 (100%)                   | 223 (100%)                   | 223 (100%)                   |

Les prévalences des allèles mutants *Pfdhfr*51I, *Pfdhfr*59R, *Pfdhfr*108N étaient au-dessus de 94%. La prévalence de l'allèle mutant *Pfdhps*437G était de 5,38% et celle de l'allèle mutant *Pfdhps*540E prévalait 4,04%.

**Tableau VIII: Prévalence des triples, quadruples et quintuples mutants des gènes *Pfdhfr*/*Pfdhps* en 2012**

| Allèles         | <i>Triple mutant</i><br><i>Pfdhfr</i> N51I, C59R,<br>S108N<br>n (%) | <i>Quadruple mutant</i><br>( <i>Pfdhfr</i> triple mutant<br>plus <i>Pfdhps</i> A437G<br>mutant)<br>n (%) | <i>Quintuple mutant</i><br>( <i>Quadruple mutant</i> plus<br><i>Pfdhps</i> K540E<br>Mutant)<br>n (%) |
|-----------------|---|--|--|
| <b>Sauvages</b> | 23(10,31)   | 211 (94,62)  | 222(99,55)   |



**Evaluation des marqueurs moléculaires de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'amodiaquine après sept cycles de chimio-prévention du paludisme saisonnier dans le district sanitaire de Moïssala, Tchad**

|                |            |           |          |
|----------------|------------|-----------|----------|
| <b>Mutants</b> | 200(89,69) | 12 (5,38) | 1 (0,48) |
| <b>Total</b>   | 223        | 223       | 223      |

La prévalence des triples mutants *Pfdhfr* atteignait presque 90%. La prévalence des quadruples mutants s'élevait à 5,38% et celle des quintuples mutants prévalait 0,48%.

**Tableau IX: Prévalence des allèles des gènes *PfcrtrK76T* et *Pfmdr1N86Y* en 2012**

| <b>Allèles</b>  | <b><i>PfcrtrK76T</i><br/>n (%)</b> | <b><i>Pfmdr1N86Y</i><br/>n (%)</b> |
|-----------------|------------------------------------|------------------------------------|
| <b>Sauvages</b> | 175 (78,48)                        | 203 (91,03)                        |
| <b>Mutants</b>  | 48 (21,52)                         | 9 (8,97)                           |
| <b>Total</b>    | 223                                | 223                                |

Les prévalences des allèles mutants *Pfcrtr76T* et *Pfmdr1 86Y* étaient respectivement de 21,52% et de 8,97% en 2012.

**Tableau X: Prévalence des allèles des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* en 2021**

| <b>Allèles</b>  | <b><i>PfdhfrN51I</i><br/>n (%)</b> | <b><i>PfdhfrC59R</i><br/>n (%)</b> | <b><i>PfdhfrS108N</i><br/>n (%)</b> | <b><i>PfdhpsA437G</i><br/>n (%)</b> | <b><i>PfdhpsK540E</i><br/>n (%)</b> |
|-----------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Sauvages</b> | 0                                  | 0                                  | 7 (3)                               | 149 (59,8)                          | 225 (91,1)                          |
| <b>Mutants</b>  | 214 (100)                          | 249 (100)                          | 216 (97)                            | 100 (40,2)                          | 22 (8,9)                            |
| <b>Total</b>    | 214 (100)                          | 249 (100)                          | 223 (100)                           | 249 (100)                           | 247 (100)                           |

Les prévalences des allèles mutants *Pfdhfr51I*, *Pfdhfr59R*, *Pfdhfr108N* étaient au-dessus de 97%. La prévalence de l'allèle mutant *Pfdhps437G* s'élevait à 40,2% et celle de l'allèle mutant *Pfdhps540E* s'élevait à 8,9% en 2021.

**Tableau XI: Prévalence des triples, quadruples et quintuples mutants des gènes *Pfdhfr/Pfdhps* en 2021**

| Allèles         | <i>Triple mutant</i><br><i>Pfdhfr</i> N51I, C59R,<br>S108N<br>n (%) | <i>Quadruple mutant</i><br>( <i>Pfdhfr</i> triple mutant<br>plus <i>Pfdhps</i> A437G<br>mutant)<br>n (%) | <i>Quintuple mutant</i><br>( <i>Quadruple mutant</i> plus<br><i>Pfdhps</i> K540E mutant<br>n (%)) |
|-----------------|---|--|---|
| <b>Sauvages</b> | 6 (3,1)   | 111 (59)   | 176 (97,2)  |
| <b>Mutants</b>  | 186 (96,9)  | 77 (41)  | 5 (2,8)   |
| <b>Total</b>    | 192 (100)   | 188 (100)  | 181 (100)   |

La prévalence des triples mutants *Pfdhfr* atteignait presque 97%. La prévalence des quadruples mutants s'élevait à 41% et celle des quintuples mutants était de 2,8% en 2021.

**Tableau XII: Prévalence des allèles des gènes *Pfprt*K76T et *Pfmdr1*N86Y en 2021**

| Allèles         | <i>Pfprt</i> K76T<br>n (%) | <i>Pfmdr1</i> N86Y<br>n (%) |
|-----------------|----------------------------|-----------------------------|
| <b>Sauvages</b> | 204 (88,7)                 | 231 (96,3)                  |
| <b>Mutants</b>  | 26 (11,3)                  | 9 (3,7)                     |
| <b>Total</b>    | 230 (100)                  | 240 (100)                   |

Les prévalences des allèles mutants *Pfprt*76T et *Pfmdr1* 86Y étaient relativement faibles avec des valeurs respectives de 11,3% et de 3,7% en 2021.

**Comparaisons des résultats de l'année 2012 avec ceux de 2021**

**Tableau XIII: Comparaison des prévalences de triples mutants, quadruples mutants et quintuples mutants de 2012 à 2021**

| <b>Année</b>      | <b>Triples mutants<br/>%(n)</b> | <b>Quadruples mutants<br/>%(n)</b> | <b>Quintuples mutants<br/>%(n)</b> |
|-------------------|---------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| <b>Année 2012</b> | 89,69 (223)                     | 5,38 (223)                         | 0,5 (223)                          |
| <b>Année 2021</b> | 96,89 (192)                     | 40,96 (188)                        | 2,76 (181)                         |
| <b>p</b>          | 0,004                           | < 0,001                            | 0,056                              |

Nous avons observé une différence statistiquement significative entre les triples mutants *Pfdhfr* de l'année 2012 et de 2021 ( $p = 0,004$ ).

La différence entre les prévalences des quadruples mutants de 2012 et 2021 était également statistiquement significative avec des taux respectifs de 5,38% et 40,96% ( $p < 0,001$ ).

Quant aux quintuples mutants, nous n'avons pas observé de différence statistiquement significative entre 2012 et 2021 même si la tendance semble être en faveur de 2021 avec des prévalences respectives de 0,5% vs 2,76% ( $p = 0,056$ ).

Tableau XIV: Comparaison des prévalences des allèles mutants *Pfcr*t 76T et *Pfmdr*1 86Y de 2012 à 2021

| Année      | <i>Pfcr</i> t76T<br>%(n) | <i>Pfmdr</i> 186Y<br>%(n) | Double mutant<br><i>Pfcr</i> t/ <i>Pfmdr</i> 1 |
|------------|--------------------------|---------------------------|--|
| Année 2012 | 21,52 (223)              | 08,97 (223)               | 1,17 (223)                                     |
| Année 2021 | 11,30 (230)              | 03,75 (240)               | 2,24 (249)                                     |
| <b>p</b>   | <b>0,0033</b>            | <b>0,0206</b>             | <b>0,3617</b>                                  |

Nous avons observé que la différence était statistiquement significative entre les prévalences des allèles mutants de 2012 et 2021 aussi bien pour *Pfcr*t que pour *Pfmdr*1, de même pour le double mutant *Pfcr*t/*Pfmdr*1.

Nous avons noté une baisse de prévalence des mutants de 2012 à 2021.

# COMMENTAIRES ET DISCUSSION

## 6 COMMENTAIRES ET DISCUSSION :

Nos résultats ont montré que les prévalences des triples mutants (*Pfdhfr*) et des quadruples mutants (*Pfdhfr*+*Pfdhps*437) ont significativement augmenté entre 2012 et 2021. Tandis que les prévalences des mutants *Pfcr*76T et *Pfmdr*1 86Y ont baissé de moitié, ce qui atteste que la molécule partenaire de la CPS qui est l'amodiaquine peut toujours être utilisée dans cette stratégie de prévention.

Nous n'avons pas observé une augmentation significative des mutations quintuples ce qui rassure que la SP puisse continuer à être utilisée dans les stratégies de prévention.

### ✓ Prévalence des triples mutants du gène *Pfdhfr* au Tchad

Les prévalences des triples mutants *Pfdhfr*51I, *Pfdhfr*59R, *Pfdhfr*108N étaient au tour de 90% en 2012 et de 97% en 2021. Nous avons observé une augmentation de triple mutant de 2012 à 2021 avec une différence statistiquement significative.

Cette augmentation témoigne que la pression de la CPS aurait contribué à la sélection des allèles mutants *Pfdhfr* à Moïssala ; Tchad.

Notre résultat de prévalence de triple mutation de 97% en 2021 était comparable aux résultats suivants : 97% de prévalence au Tchad en 2020 par Traore B. et *al.*, [17] , 99% prévalence au Cameroun en 2017 par Tobias O. et *al.*, [68] et 95% de prévalence au Ghana en 2012 par Duha NO et *al.*, [69].

Par contre la prévalence de 97% de triples mutations en 2021 était largement supérieure à celles de 3,33% et de 38,2% observées respectivement au Tchad en 2018 par Mahamat I S et *al* [18] et au Mali en 2019 par Moustaf O et *al.*, [70]. La différence avec l'étude de Mahamat I S et *al.*, et de Moustaf O et *al.*, pourrait s'expliquer par une différence dans la méthodologie qui révèle que ces auteurs ont travaillé sur une trentaine et une soixante d'échantillons à l'échelle national tandis que la nôtre a porté sur 249 échantillons en 2021.

#### ✓ Prévalence de mutations quadruples au Tchad

Les prévalences de quadruples mutations (*Pfdhfr* triple mutant + *Pfdhps437* mutant) représentaient 5,3% en 2012 et 41% en 2021.

Notre résultat de quadruples mutants de 2021 était comparable à celui obtenu par Traore B et *al.*, au Tchad qui était de 41,7% en 2020 [17], par contre largement supérieur à celui de 25% obtenu en Angola en 2016 par Kaingona D et *al.*, [71]. Cette large différence s'expliquerait probablement d'une part, par une faible taille d'échantillons de l'étude Angolaise qui a porté sur 52 échantillons et d'autre part, par la différence de la pression médicamenteuse.

La prévalence de quadruples mutations de 41% dans notre étude était inférieure à celle de 57,6% observée par Maiga H et *al.*, en 2012 au Mali [55]. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le Mali a implémenté la CPS avant le Tchad donc la pression médicamenteuse serait plus grande sur les parasites du Mali.

#### ✓ Prévalence de mutations quintuples au Tchad

La prévalence de mutations quintuples (quadruple mutant + *Pfdhps 540* mutant) représentait 2,8 % en 2021 qui est supérieure à celle de 0,5% obtenue en 2012 dans la même zone. Bien que la comparaison entre les deux années n'ait pas révélé de différence statistiquement significative, une tendance de sélection se dégage en faveur de 2021.

Nos résultats de prévalence de mutations quintuples étaient comparables à la prévalence de 2,1% observée en 2018 par Emrah RUH et *al.*, en République Démocratique du Congo [72].

Nos résultats de mutations quintuples étaient inférieurs à ceux rapportés au Mali par Dicko A et *al.*, en 2007 qui ont obtenu 11,6% de prévalence [73] ; nos résultats étaient également inférieurs à ceux de 9,6% obtenu en Guinée par Bonnet M et *al.*, en 2007 [74].

Cette différence avec l'étude du Mali et de la Guinée pourrait s'expliquer par le fait que ces deux pays ont implémenté la CPS avant le Tchad donc la pression médicamenteuse serait plus grande sur ces parasites.

✓ **Prévalence de l'allèle mutant du gène de la chloroquino-résistance transporter (*Pfprt76T*) au Tchad**

La prévalence de l'allèle mutant du gène *Pfprt 76T* représentait 21,52% en 2012 et 11,3% en 2021, soit une réduction de près de la moitié. Cette baisse de prévalence de *Pfprt 76T* pourrait s'expliquer par l'abandon de la chloroquine depuis près de deux décennies.

Nos résultats étaient inférieurs à la prévalence de 37,9% trouvée au Tchad en 2020 par Traore B et *al.*, [17]. Cette différence pourrait s'expliquer par la particularité de l'étude de Traore B et *al.*, qui était une enquête nationale tandis que la nôtre a concerné seulement une seule région.

Par ailleurs, nos résultats étaient inférieurs à ceux trouvés par Beshir K et *al.*, qui ont effectué une étude dans différents pays en 2016 et ont rapporté des prévalences suivantes [75]:

Au Mali (78,76%), Burkina Faso (29,81%), Niger (22,68%), Tchad (55,35%), Gambie (49,10%), Guinée (62,24%).

✓ **Prévalence de l'allèle mutant du gène multi-drug résistance 1 de *P. falciparum* (*Pfmdr1 86Y*)**

La prévalence de l'allèle mutant du gène *Pfmdr1 86Y* était de 3,7% en 2021 et de 8,97% en 2012. Nous avons constaté une diminution significative du taux de mutants après 10 ans de passage au sein de la même population d'étude. Beshir K et *al.*, dans différents pays en 2016 ont rapporté des taux de prévalence tous supérieurs aux nôtres excepté ceux de la Gambie (0%) ; tandis que les prévalences des autres pays : Mali (18,66%) ; Burkina Faso (12,40 %) ; Niger (7,02%) ; Tchad (23,78%) ; Gambie (0%) ; Guinée (15,88%)[75] sont tous supérieurs. Cette réduction de prévalence de près de la moitié pourrait s'expliquer par l'usage des médicaments partenaires des CTA tels que la luméfantine qui sélectionne les allèles sauvages contrairement aux autres molécules partenaires.

✓ **La comparaison des triples, quadruples et quintuples mutants de 2012 et de 2021**

Durant la période de 2012 et 2021 de CPS au sein de la même population, nous avons remarqué une augmentation statistiquement significative des prévalences des triples mutants 89,7% vs 96,9% ( $p < 0,05$ ) et des quadruples mutants 5,38% vs 40,96% ( $p < 0,01$ ).



Au Ghana, une étude de 2003 à 2010 menée par Duah NO et *al.*, sur la prévalence des marqueurs moléculaires de Sulfadoxine- Pyriméthamine a trouvé une tendance comparable de sélection statistiquement significative des triples et quadruples mutants de 2003 à 2010 [69]. Cette augmentation des triples et quadruples mutations au sein de la population de Moïssala aussi bien qu'au Ghana pourrait s'expliquer par la pression médicamenteuse exercée par les médicaments de la chimio prévention.

Quant au quintuple mutant, nous n'avons pas trouvé de différence statistiquement significative entre les prévalences de 2012 et 2021 ; Mais la tendance semble se dégager en faveur d'une augmentation en 2021.

✓ **La comparaison des allèles mutants *Pfcr* 76T et *Pfmdr1* 86Y de 2012 vs 2021 :**

Il y a une diminution statistiquement significative entre les prévalences de l'allèle mutant *Pfcr* 76T de 2012 à 2021 ( $p = 0,0033$ ).

Nous avons également noté une baisse significative des allèles mutants *Pfmdr1* 86Y de 2012 à 2021 avec  $p = 0,0206$ .

Après l'analyse de double mutant *Pfcr/Pfmdr* dans la même période 2012 et 2021 nous avons noté une tendance à la baisse avec  $p = 0,3617$

La baisse de sélection de ces deux marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* rassure au moins que l'une des molécules partenaires de la CPS qui est l'amodiaquine n'aurait pas contribué à la sélection des marqueurs moléculaires de résistance durant les campagnes de CPS.

### **Limite de l'étude**

L'absence des caractéristiques socio-démographiques des participants et les données sur l'observance ont été les principales limites de cette étude.

# CONCLUSION

## 7 CONCLUSION :

Au terme de notre étude sur la surveillance moléculaire lors de la CPS de 2012 à 2021, nous avons constaté une élévation de la prévalence des triples mutants *Pfdhfr* (51I, 59R, 108N) et quadruples mutants *Pfdhfr* (51I, 59R, 108N) + *Pfdhps*437G. Nous n'avons pas noté d'augmentation significative de quintuple mutant (*Pfdhfr* (51I, 59R, 108N) + *Pfdhps* (437G +540E)).

Les prévalences des allèles mutants *Pfcr* 76T et *Pfmdr1* 86Y étaient relativement élevées mais faibles comparées aux années précédentes (2012).

Cette étude a permis d'établir une relation entre la sélection des allèles *Pfdhfr* (51I, 59R, 108N), *Pfdhps* (437G +540E), due à la pression médicamenteuse (Sulfadoxine-Pyriméthamine) au cours des 10 années de la CPS. Une réduction de prévalence pour *Pfcr* 76T et *Pfmdr1* 86Y induit par l'utilisation de la luméfantine dans les combinaisons thérapeutiques et l'abandon de la chloroquine.

Au vu des taux de prévalence des sélections d'allèles mutants et de l'association de certains allèles mutants particulièrement la mutation quadruple à Mandoul (Tchad), il serait judicieux d'étendre cette étude dans d'autres zones afin d'obtenir des données représentatives du pays.

Et maintenir une surveillance permanente des marqueurs de résistance liés aux différentes combinaisons des antipaludiques adoptés pour la prévention du paludisme.

# RECOMMANDATIONS

## **8 RECOMMANDATIONS :**

Aux termes de notre étude nous formulons les recommandations suivantes :

### **Aux autorités administratives et politiques de santé de la République du Tchad :**

- De mettre en place des laboratoires de biologie moléculaire au niveau régional ou les sites sentinelles de surveillance afin de mettre l'accent sur la surveillance de l'efficacité de molécules antipaludiques.

### **Aux chercheurs :**

- De continuer à surveiller les marqueurs moléculaires de résistance aux antipaludiques avant et après les campagnes de la chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS) afin de fournir des résultats fiables au PNLP pour une meilleure prise en charge du paludisme.

### **A la population :**

- De prendre correctement les médicaments fournis lors des campagnes de la Chimio prévention du Paludisme Saisonnier pour éviter le risque de survenue de la chimiorésistance.

# REFERENCES

## 9. REFERENCES

- [1] RAJAONARIVELO V et al., Les anophèles et la transmission du paludisme à Ambohimena, village de la marge occidentale des Hautes-Terres Malgaches, Parasite, vol. 11, no. 1, pp. 75–82, 2004. n.d.
- [2] SCHINDER T. SCHINDLER T et al., Molecular monitoring of the diversity of human pathogenic malaria species in blood donations on Bioko Island, Equatorial Guinea, Malar. J., vol. 18, no 1, pp. 9. 2019. n.d.
- [3] VÁSQUEZ A.M et al., Malaria in pregnancy in endemic Regions of Colombia : High Frequency of Asymptomatic and Peri-Urban Infections in Pregnant Women with Malaria, Infect. Dis. Obstet. Gynecol., vol. 2020, pp. 1-10, 2020. n.d.
- [4] METELO E et al., Détermination des paramètres bioécologiques et entomologiques d'*Anopheles gambiae* sl dans la transmission du paludisme à Bandundu-ville, République Démocratique de Congo, Pan Afr. Med. J., vol. 22, 2015. n.d.
- [5] BATRANE A. Evaluation des marqueurs moléculaires de résistance de *Plasmodium falciparum* à la Sulfadoxine plus Pyriméthamine et à l'Amodiaquine après l'adoption de la chimio prévention du paludisme saisonnier en République du Tchad., Mémoire Biologie moléculaire Pharmacie., pp 5-6., USTTB Mali 2022 n.d.
- [6] OMS 2021. OMS., Paludisme dans le monde. Rapport 2021. Available from : [www.who.int/malaria](http://www.who.int/malaria) no. 266 000, pp. 1–24, 2021. n.d.
- [7] Nicolas R. Impacts de la pandémie de Covid-19 sur le contrôle des autres maladies en Afrique., Rev Med Suisse ; vol 17 : pp 521-3 2021 n.d.
- [8] Aubry P et al. Paludisme, Actualités 2022 medecine tropical., 2022 n.d.
- [9] United Nations Office for the Coordination of Humanitarian Affairs (UNOCHA). Paludisme : facteurs aggravant de la mortalité maternelle., Source : <https://www.unocha.org/chad>. TCHAD 2021 n.d.
- [10] Corne Philippe H. et al., Antibiotique, Paludisme grave d'importation chez l'adulte : diagnostic et traitement Severe imported malaria in adults : diagnosis and treatment., Elsevier vol 6, pp 229-235 ? 2004 n.d.
- [11] Enquête sur les Indicateurs du Paludisme (EIPM), république du Mali., pp 1-2., 2015. n.d.
- [12] FH Yandaï, K Moundine, et al., Perception of malaria risks and use of mosquito nets in Chad., International journal of biological and chemical sciences. Vol. 11 No. 1. 2017 n.d.

- [13] Agrica project : Profil de risque climatique - source : <https://www.agrica.de/>, Tchad 02-08. 2021 n.d.
- [14] Organisation mondiale de la Santé : Recommandation de politique générale de l’OMS : Chimio-prévention du paludisme saisonnier pour lutter contre le paludisme à *Plasmodium falciparum* en zone de forte transmission saisonnière dans la sous-région du Sahel en Afrique. WHO/HTM/GMP. 2012 n.d.
- [15] Maiga H et al. Seasonal Malaria Chemoprevention with Sulphadoxine-Pyrimethamine and Amodiaquine Selects Pfdhfr-dhps Quintuple Mutant Genotype in Mali., /journal.pone.0162718 Vol :58 pp : 113-118 sept 2016. n.d.
- [16] Zongo I. et al., Randomized non-inferiority trial of dihydroartemisinin-piperaquine compared with sulfadoxine-pyrimethamine plus amodiaquine for SMC in Burkina Faso. Antimicrobial agents and chemotherapy., London School of Hygiene & Tropical Medicine vol :59 pp :11 Aug 2015. n.d.
- [17] TRAORE B. Épidémiologie Moléculaire de la résistance de *plasmodium Falciparum* aux Antipaludique en République du Tchad., These pharmacie., pp 90-105., Mali 2020 n.d.
- [18] Issa Mahamat S. et al., Efficacité thérapeutique de l’association artésunateamodiaquine et polymorphisme des gènes dihydrofolate réductase, dihydroptéroate synthétase et kelch 13 propeller à Pala (République du Tchad). Parasitologie. Université Félix Houphouët-Boigny (Abidjan, Côte d’Ivoire), ffNNT : ff. fftel-02387676 no. 1, pp. 271–277, 2018. n.d.
- [19] Chaudhury A. The forgotten malariologist : Giovanni Battista Grassi (1854–1925). Trop Parasitol., pp16-8., 2021 n.d.
- [20] MIGLIANI R. et al., Histoire de la lutte contre le paludisme dans l’armée française : de l’Algérie à l’Armée d’Orient pendant la Première Guerre mondiale, Medecine et Santé Tropicales 2014 ; 24 : 349-361. n.d.
- [21] GISSOT Mathieu., Etude de la régulation transcriptionnelle des gènes lors du cycle érythrocytaire de *Plasmodium falciparum*. Thèse de doctorat. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI. Vol 3. p. 211. 14 Fev 2005. n.d.
- [22] FRANCIS E. C., History of the discovery of the malaria parasites and their vectors, Parasit. Vectors, vol. 3, no 1, pp. 5, 2010. n.d.
- [23] GRASSI B : Malariology centenary. Parasitologia. A zoologist for malaria, Contrib. Sci., vol. 3, no 2, p. 187-195, 2006. n.d.



- [24] TIBÚRCIO F et al., Specific expression and export of the *Plasmodium falciparum* Gametocyte exported Protein-5 marks the gametocyte ring stage, *Malar. J.*, vol. 14, no 1, p. 334, 2015 n.d.
- [25] CHARMOT G., Laveran and the discovery of the Malaria Parasite, CDC Malaria website, vol. 1841. p. 1-5, 2012. n.d.
- [26] Mouchet J. Biodiversité du paludisme dans le monde. John Libbey Eurotext ; 2004.
- [27] Schindler T, Robaina T, Sax J, Bieri JR, Mpina M, Gondwe L, et al. Molecular monitoring of the diversity of human pathogenic malaria species in blood donations on Bioko Island, Equatorial Guinea. *Malar J* 2019 ;18 :9. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2639-8>.
- [28] SONDO P. et al. Polymorphisme de *Plasmodium falciparum* et mutations des gènes de la résistance Pfcrt et Pfmdr1 dans la zone de Nanoro - *Journal médical panafricain.*, vol. 39, pp1-9., 2021 n.d.
- [29] L'histoire de la découverte de l'artémisinine-Artemisia annua L. aux artémisinine 2019 n.d.
- [30] Prevention C-C for DC and. CDC - Malaria - About Malaria - Biology 2020. <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html> (accessed March 20, 2023).
- [31] SINDEN R.E et al., The development of Plasmodium ookinetes in vitro : an ultrastructural study including a description of meiotic division. *Parasitology*, 91 : 227-244, 1985. n.d.
- [32] FREVERT U et al., Plasmodium sporozoit passage across the sinusoidal cell layer. (D. S.-F. Barbara A Burleigh, Éd.) *Molecular mechanism of parasite invasion*, pp. 183-197, 2008. n.d.
- [33] Wagner M. The role of PLA2 enzymes in host cell cytosol uptake and blood stage growth of Plasmodium falciparum. These de doctorat. Université Paris Cité, 2021.
- [34] STURN A et al., Manipulation of host hepatocytes by malaria parasites for delivery into sinusoids. *Science*, 313, 1287-1290, 2006. n.d.
- [35] ] MURPHY J. R et al., Continuation of chloroquine-susceptible *Plasmodium falciparum* parasitemia in volunteers receiving chloroquine therapy, *Antimicrob. Agents Chemother.* vol. 34, no. 4, pp. 676–679, 199 n.d.
- [36] ROBERT V et al., Biologie de la transmission homme - moustique du *Plasmodium*. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 96, 6-20, 2003. n.d.
- [37] TALMAN A. M et al., Gametocytogenesis : The puberty of *Plasmodium falciparum*, *Malar. J.*, vol. 3, pp. 1–14, 2004. n.d.

- [38] BANNISTER L.H et al., A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitology Today*, 16, 427- 433, 2000. n.d.
- [39] Siden-Kiamos I, Louis C. Interactions between malaria parasites and their mosquito hosts in the midgut. *Insect Biochem Mol Biol* 2004 ;34 :679–85. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.03.026>.
- [40] Kaiser K, Matuschewski K, Camargo N, Ross J, Kappe SHI. Differential transcriptome profiling identifies Plasmodium genes encoding pre-erythrocytic stage-specific proteins. *Mol Microbiol* 2004 ;51 :1221–32. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03909.x>.
- [41] GOLVAN J.Y et al., *Eléments de parasitologie médicale* : Paris : 4ère Ed, Flammarion, 571p, 1983. n.d.
- [42] DJIBO A et al., Black water fever in adults with sickle cell anemia. Two fatal cases. *Med Trop* 2000 ; 60 :156-68. n.d.
- [43] World Health Organization, Division of Control of Tropical Diseases : Severe and complicated malaria., *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Volume 84, Issue Supplement\_2, 1990, Pages 1–65 online 23 March 2004. n.d.
- [44] Legros F. Paludisme d ' importation en France : modalités de surveillance et principales caractéristiques épidémiologiques 2008 ; XXIII :100–8.
- [45] G Moretti, J C Favarel-Garrigues, A Broustet, V Veyret., Hemoglobinuric bilious fever due to *Plasmodium falciparum* infection. Apropos of a fatal case., *Annales de Medecine Interne*,125(5) :453-457, 01 May 1974. n.d.
- [46] Djibo A, Souna Amadou A, Brah Bouzou S. Black water fever in adults with sickle cell anemia. Two fatal cases. *Med Trop* 2000 ;60 :156-68 n.d.
- [47] WHO. Severe and complicated malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* ed. 2000 n.d.
- [48] DELLICOUR S et al., The safety of artemisinin during pregnancy : à pressing question. *Malar J*. 2007 Feb 14 ;6 :15. n.d.
- [49] Gaye O et al Etude comparative de cinq methodes de Diagnostic biologique du paludisme : la goutte epaisse, la methode de QBC, la sonde, la PCR et le parasight F test. *medecine noire.*, pp 245-247, 1998. n.d.
- [50] KOITA O.A., et al., False-negative rapid diagnostic tests for malaria and deletion of the histidine-rich repeat region of the hrp2 gene. *Am J Trop Med Hyg*, 2012. 86(2) : p. 194-8. n.d.

- [51] AMBROISE T.P et al., Le diagnostic du paludisme : Le diagnostic du paludisme : actualités et perspectives. Cahiers Santé, 1993,3 : 280-284. n.d.
- [52] STAEDKE SG al. Amodiaquine, sulfadoxine/pyrimethamine, and combination therapy for treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in Kampala, Uganda : à randomised trial. The Lancet. 2001 ;358(9279) :368-74. n.d.
- [53] WHO : Traitement préventif intermittent du nourrisson à la sulfadoxine pyriméthamine (TPIIn-SP) pour lutter contre le paludisme en Afrique., Guide de la mise en œuvre sur le terrain <http://www.who.int/malaria/en/WHO/IVB/11.07.>, 2011 n.d.
- [54] Traore PI, Kouriba DB. DARA Antoine. Comparaison de deux techniques moléculaires de surveillance de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum*., Thèse pharmacie 2009 n.d.
- [55] Maiga H et al. Seasonal Malaria Chemoprevention with Sulphadoxine-Pyrimethamine and Amodiaquine Selects Pfdhfr-dhps Quintuple Mutant Genotype in Mali. Sullivan DJ, éditeur. PLOS ONE. 23 sept 2016 ;11(9). n.d.
- [56] Djimdé A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourté Y, et al. A Molecular Marker for Chloroquine-Resistant *Falciparum* Malaria. N Engl J Med 2001 ;344 :257–63. <https://doi.org/10.1056/NEJM200101253440403>.
- [57] Basco LK, Ringwald P. Analysis of the Key pfert Point Mutation and In Vitro and In Vivo Response to Chloroquine in Yaoundé, Cameroon. J Infect Dis 2001 ;183 :1828–31. <https://doi.org/10.1086/320726>.
- [58] WUNSCH et al., Differential Stimulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Determines Chloroquine Uptake in *Plasmodium falciparum*, Cell biology 140 (2) : 335–345, Germany1997. n.d.
- [59] DIEUDONNÉ Makaba Mvumbi., Place de la biologie moléculaire dans l'épidémiologie, le diagnostic et l'évaluation de la chimiorésistance du paludisme en République Démocratique du Congo, PhD, 2017 n.d.
- [60] CISSE Fatoumata. Evaluation de l'efficacité in vivo de la pyronaridine-artesunate dans le traitement du paludisme non compliqué à Plasmodium spp à Faladje, Kati, Mali, thèse pharmacie 2022 n.d.
- [61] WHO Division of Control of Tropical Diseases, CTD/MAL/97.20 Rev. 2 2001, In vitro micro-test (Mark III) for the assessment of the response of *Plasmodium falciparum* to chloroquine, mefloquine, quinine, amodiaquine, sulfadoxine/pyrimethamine and artemisinin instructions for use of the in vitro micro-test kit (Mark III), 2nd rev n.d.

- [62] Emna S. et al. Contribution of polymerase chain reaction for detection of malaria in Tunisia]. Tunisie Medicale [La]. 2015 ; 93 (12) : 766-770 n.d.
- [63] MULLIS K et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro : the polymerase chain reaction 1985. n.d.
- [64] Wickenhauser C et al. Secretion of cytokines (interleukins-1 alpha, -3, and-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) by normal human bone marrow megakaryocytes., Blood 85 (3) : 685–691 1995 n.d.
- [65] BERNASCONI M. Comparaison des coûts du diagnostic moléculaire des rétinites pigmentaires entre le séquençage selon Sanger et un séquençage à haut débit ? Université de lausanne, PhD Médecine., 2012 n.d.
- [66] Angeletti B et al. Southern and northern blot fixing by microwave oven. 1995 Mar 11 ; 23(5) : 879–880 n.d.
- [67] Romain GS, Maimouna Y. VARIABILITE CLIMATIQUE ET EMERGENCE DU PALUDISME A BONGOR (TCHAD) 2019.
- [68] TOBIAS O. et al, Molecular markers for artemisinin and partner drug resistance in natural *Plasmodium falciparum* populations following increased insecticide treated net coverage along the slope of mount Cameroon : Cross-sectional study, Infect. Dis. Poverty, vol. 6, no. 1, pp. 1– 10, 2017. n.d.
- [69] Duah NO, et al., Surveillance of molecular markers of *Plasmodium falciparum* resistance to sulphadoxine-pyrimethamine 5 years after the change of malaria treatment policy in Ghana. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 2012 [cited 2013 Dec 13] ;87 :996–1003. n.d.
- [70] Moustaf O et al., Prévalence des mutations sur le gène Pfdhfr dans les localités de Dioro, Missira et Sélingué. Thèse de Pharmacie. Bibliosante Mali 2019 n.d.
- [71] Kaingona D. et al., Low-grade sulfadoxine–pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* parasites from Lubango, Angola. Malaria Journal volume 15, Article number : 309 pp 3-6 (2016) n.d.
- [72] EMRAH R et al, Molecular identification of sulfadoxine - pyrimethamine resistance in malaria infected women who received intermittent preventive treatment in the Democratic Republic of Congo, Malar. J., pp. 1–7, 2018. n.d.

- [73] DICKO A et al, Molecular markers of resistance to sulphadoxine-pyrimethamine one year after implementation of intermittent preventive treatment of malaria in infants in Mali., *Malaria Journal* volume 9, Article number : 9 pp. 1–7, Jan 2010. n.d.
- [74] BONNET M et al, Efficacy of antimalarial treatment in Guinea : in vivo study of two artemisinin combination therapies in Dabola and molecular markers of resistance to sulphadoxine-pyrimethamine in N'Zérékoré., *malaria journal.*, 2007 n.d.
- [75] BESCHIR K et al. Prevalence of *Plasmodium falciparum* haplotypes associated with resistance to sulfadoxine-pyrimethamine and amodiaquine before and after upscaling of seasonal malaria chemoprevention in seven African countries : à genomic surveillance study., 2022. *Lancet Infect Dis* Oct 2022 n.d. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00593-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00593-X).

10. ANNEXES :

**Fiche signalétique :**

**Nom : DOUMBIA**

**Prénom : Moussa**

**Titre de la thèse : Evaluation des marqueurs moléculaires de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'amodiaquine après sept cycles de chimio-prévention du paludisme saisonnier dans le district sanitaire de Moïssala, Tchad**

**Année de soutenance : 2022-2023**

**Ville de soutenance : Bamako**

**Pays d'origine : MALI**

**Lieu de dépôt : Bibliothèque de l'Université Kankou Moussa Bamako**

**Courriel : msam.dbia@gmail.com**

**Tel : 00223 74515668**

**Secteurs d'intérêt : santé publique, épidémiologie, parasitologie.**

**Résumé de la thèse :**

**Introduction :** Le paludisme, maladie endémique qui engendre énormément de perte tant économique et en vie humaine particulièrement les enfants de moins de 5 ans. Cette étude transversale s'est fixée pour but d'évaluer l'impact de dix années de la CPS sur la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine pyriméthamine et à l'amodiaquine. En vue de comparer les résultats de 2012 à celui de 2021 pour surveiller efficacité du traitement et adapter la politique de prise en charge du paludisme au sein des populations vulnérables.

**Méthodologie :** Nous avons analysé des échantillons collectés des études antérieures menées au Tchad en 2012 et 2021. L'analyse moléculaire a été faite par PCR-RFLP. Il s'agissait de rechercher les allèles mutants des gènes *Pfdhfr*, *Pfdhps*, *Pfcrt* et *Pfmdr1*.

**Résultats :** Au total 223 échantillons de 2012 et 247 échantillons de 2021 ont été analysés. Nous avons constaté une augmentation statistiquement significative de prévalences : pour les triples mutant 89,7% vs 96,9% ( $p < 0,05$ ), pour le quadruple 5,38% vs 40,96% ( $p < 0,01$ ). Nous n'avons pas noté d'augmentation significative de quintuple mutant. Par ailleurs, une baisse des prévalences de l'allèle mutant de *Pfcrt* et *Pfmdr1* a été notée.

**Conclusion :** Nous avons trouvé une sélection significative des triples et quadruples mutants et une baisse de prévalences des mutants de *Pfcrt* et de *Pfmdr1*.

**Last Name :** DOUMBIA

**First name :** Moussa

**Title of the thesis:** Evaluation of molecular markers of *Plasmodium falciparum* resistance to sulfadoxine-pyrimethamine and amodiaquine after seven cycles of chemoprevention of seasonal malaria in Moïssala health district, Chad

**Defense year :** 2022-2023

**Defense city :** Bamako

**Country of origin :** MALI

**Place of deposit :** Library of Kankou Moussa Bamako University

**Email :** msam.dbia@gmail.com

**Phone :** 00223 74515668

**Areas of interest :** public health, epidemiology, parasitology.

**Summary of the thesis :**

**Introduction :** Malaria, an endemic disease that causes enormous loss of both economic and human life, particularly children under 5 years old. This cross-sectional study aimed to assess the impact of ten years of SMC on the prevalence of molecular markers of *P. falciparum* resistance to sulfadoxine pyrimethamine and amodiaquine. In order to compare the results of 2012 with those of 2021 to monitor the effectiveness of treatment and adapt the policy for the management of malaria in vulnerable populations.

**Methodology :** We analyzed samples collected from previous studies conducted in Chad in 2012 and 2021. Molecular analysis was done by PCR-RFLP. This involved looking for the mutant alleles of *Pfdhfr*, *Pfdhps*, *Pfcrt* K76T and *Pfmdr1* genes.

**Results :** Overall, 223 samples in 2012 and 247 samples in 2021 have been genotyped. We observed a statistically significant increase : for the triple mutants 89.7% vs 96.9% ( $p < 0.05$ ), for quadruple 5.38% vs 40.96% ( $p < 0.01$ ). There was no significant selection of quintuple mutant (*Pfdhfr* + *Pfdhps*). In addition, a decrease of mutant prevalence of *Pfcrt* and *Pfmdr* was observed.

**Conclusion :** These results have shown a significant selection of the prevalence of the triple mutant and quadruple mutant and the decrease of the prevalence of mutant allele of *Pfcrt* and *Pfmdr1*.

***Serment d'Hippocrate :***

*En présence des maîtres de cette faculté, de mes chers condisciples, devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Être Suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.*

*Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.*

*Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.*

*Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui se passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.*

*Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti politique ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.*

*Je garderai le respect absolu de la vie humaine dès la conception.*

*Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.*

*Respectueux et reconnaissant envers mes maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.*

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

*Que je sois couverte d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.*

***Je le jure !***