

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

REPUBLIQUE DU MALI
Un Peuple - Un But - Une Foi



UNIVERSITE DES SCIENCES DES TECHNIQUES ET DES
TECHNOLOGIES DE BAMAKO (USTTB)

FACULTE DE PHARMACIE

THEME :

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.

Par M. Adam BATRANE

JURY

Président :	Prof. Amagana DOLO
	Prof. Issaka SAGARA
Membres :	MCA. Safiatou DOUMBO
	Dr Amadou NIANGALY
Co-directeur de mémoire :	Dr Souleymane DAMA
Directeur de mémoire :	Pr. Abdoulaye DJIMDE

Année universitaire: 2021-2022

Table des matières	
Introduction	5
1. Objectifs de l'étude	8
1.1. Objectif général	8
1.2. Objectifs spécifiques	8
2. Méthodologie	10
2.1. Cadre d'étude :	10
2.2. Type d'étude	12
2.3 Période d'étude	12
2.4. Population d'étude	12
2.4.1. Paramètres sociodémographiques	12
2.4.2. Réception des échantillons au laboratoire	12
2.4.3. Echantillonnage	12
2.5. Test statistique :	12
2.6. Aspect éthique :	12
2.7. Méthodes moléculaires	13
2.7.1. Echantillon :	13
2.7.2. L'extraction de l'ADN plasmodial :	13
La méthode d'extraction utilisée est le kit Qiagen®.	13
Matériel et réactifs	13
Mode opératoire	13
2.7.3. Les analyses moléculaires :	14
2.7.3.1. Principe :	14
2.7.3.2. Amplification de l'ADN plasmodial :	15
2.15.2. Détermination des mutations ponctuelles aux codons 437 et 540 au niveau de dihydroptéroate synthétase.	20
3. Résultats	24
4. Discussions et commentaires :	29
5. Conclusion :	33
Recommandations :	35
Références	37

Table des tableaux

Tableau I: Mélange réactionnel de la première amplification de <i>Pfdhfr</i> des codons 51 et 59 pour un volume final de 25 µl :	17
Tableau II : Programme de la première amplification de <i>dhfr</i>	17
Tableau III: Mélange réactionnel de la deuxième amplification des codons 51 et 59 de <i>Pfdhfr</i> pour un volume final de 25 µl	18
Tableau IV : Programme de la deuxième amplification des codons 51 et 59 de <i>Pfdhfr</i>	18
Tableau V: Composition du Mélange réactionnel des codons 51 et 59 de <i>Pfdhfr</i>	19
Tableau VI: Répartition des participants selon les tranches d'âges.....	24
Tableau VII: Répartition des participants en fonction des zones.....	24
Tableau VIII: Prévalence des allèles mutants du gène <i>dhfr59</i> selon les classes d'âge	25
Tableau IX: Prévalence des allèles mutants du gène <i>dhps437</i> selon les classes d'âge	25
Tableau X : Prévalence des allèles mutants du gène <i>dhps540</i> selon les classes d'âge.	26
Tableau XI : Prévalence des allèles mutants du gène <i>Pfmdr1</i> selon les classes d'âge.	26
Tableau XII: Prévalence des allèles mutants du gène <i>Pfcrt76</i> selon les classes d'âge	27

Table des figures

Figure 1 : carte du Tchad représentant les différents sites d'étude.	11
--	----

Liste des sigles

ADN : Acide Désoxyribose Nucléique
AR-L : Artéméther – Luméfantrine
ALT : Alanine-amino -transférase
AS : Artésunate
ASAQ : Artésunate-Amodiaquine
AST : Aspartate-amino-Transferase
ATPase : Adénosine triphosphatase
BB : Bleu de Bromophénol
CI : Concentration Inhibitrice
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
CO₂ : Dioxyde de carbone
CPS : Chimio-prévention du Paludisme Saisonnier
CTA : Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine
CYP2C19: Cytochrome P450 2C19
CYP3A4: Cytochrome P450 3A4
DEAP : Département d'Épidémiologie des Affections Parasitaires
DHA : Dihydroartémisinine
DHFR : DiHydroFolate Réductase
DHPS : DiHydroPtéroate Synthétase
DNTP : Désoxy Nucléotide Triphosphate
ENIPT : Enquête Nationale sur les Indicateurs du Paludisme au Tchad
FAPH : Faculté de Pharmacie
LAMP : Loop-mediated isothermal Amplification
LAV : Lutte Anti Vectorielle
LDH: Lactate Déshydrogénase
MEDRU: Molecular Epidemiology and Drug Resistance Unit
mg : milligramme
Mg²⁺ : ion magnésium
MgCl₂ : chlorure de magnésium
mm : milli molaire
mm Hg : millimètre de mercure

mmol: milli mole

MRTC: Malaria Research and Training Center

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Pb : Paire de base

*Pf*ATPase6 : Adénosine Tri Phosphatase 6 de *Plasmodium falciparum*

*Pf*EMP1 : Proteine-1 Érythrocytaire de Membrane de *Plasmodium falciparum*

*Pf*crt : *Plasmodium falciparum* chloroquine résistance transporter gène

*Pf*dhfr : *Plasmodium falciparum* Dihydrofolate Reductase gène

*Pf*dhps : *Plasmodium falciparum* Dihydropteroate Synthétase gène

*Pf*mdr1: *Plasmodium falciparum* multi-drug resistant gene 1

PM : Poids Moléculaire

PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme

PALAT : Projet d'appui à la lutte antipaludique au Tchad

PNUD : Programme De Développement Des Nations Unies

QBC : Quantitative Buffy Coat

qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction

rpm: rotation par minute

RPMI: Roosevelt Memorial Parc Institute

RSA: Ring Stage survival Assay

SD: Standard Deviation

SERCA: Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺

SNP: Single nucleotide polymorphism

SPAQ: Sulfadoxine-pyriméthamine + Amodiaquine

Taq: *Thermus aquaticus*

TBE: Tris Borate EDTA

TCP : Temps de Clairance Parasitaire

Tmax : Taux maximal

TNF- α : Tumor Necrosis Factor α

TPIg : Traitement Préventif Intermittent au cours de la grossesse

UV : Ultra-violet

μ l : microlitre

μ mol : micromole

USTTB : Université Des Sciences Des Techniques Et Des Technologies De Bamako

CICM-Mali : Centre d'Infectiologie Charles Mérieux à Bamako

IN MEMORIUM

IN MEMORIUM:

Cher Professeur Ogobara Doumbo;

Vous êtes une grande figure de la lutte contre le paludisme dans le monde, un « baobab » scientifique, hors pair. Vous étiez toujours attentif à vos cadets, doué d'une sagesse et de sens de responsabilité très élevé avec un art oratoire captivant et convainquant. Je me souviens parfaitement en 2012 quand vous étiez avec votre équipe de MRTC pour nous former en paludologie pour les acteurs du PNLP au Tchad du 27 août au 08 septembre 2012. Et, chaque fois que vous preniez la parole c'est fût motus général de tous les participants dans la salle. Personnellement, je vous ai rapproché pour recevoir vos sages conseils et au cours duquel je vous ai demandé la possibilité de venir poursuivre mes études au Mali. Votre réponse était positive et séance tenante vous m'avez donné votre adresse e-mail pour vous contacter et honnêtement chose que je n'ai pas faite. Dieu merci, après tant d'années cela vient d'être concrétisé par le Professeur Abdoulaye Djimé, Professeur Issaka Sagara et Professeur Bourema Kouriba de votre équipe de la grande famille MRTC donc c'est toujours vous.

Le monde entier reconnaît que vous avez sacrifié votre vie nuit et jour pour trouver des solutions au paludisme durant des décennies juste pour donner de sourire à l'humanité tout en entier.

Vous resterez à jamais gravé dans notre mémoire. Nous vous remercions pour tout ce que vous avez fait durant votre vie car vous avez sacrifié votre vie aux autres et au combat noble de cette lutte contre le paludisme. Aussi, vous avez mis en place une équipe forte, qui est dévouée à poursuivre le combat que vous avez commencé ensemble jusqu'à la victoire finale sur cette maladie dévastatrice qui est le paludisme.

Vous êtes une fierté mondiale et nous prions sans cesse pour le repos éternel de votre âme cher Professeur.

DEDICACE

Dédicace :

Je dédie ce présent travail à mes parents, à ma famille nucléaire, à mes tantes, à mes oncles, à mes sœurs, à mes frères, à mes cousines, à mes cousins, à mes amis, à mes collègues, en un mot à tous ceux qui sont chers pour moi. Je vous aime tous avec une profonde affection et ce travail est le vôtre.

REMERCIEMENTS

Remerciements :

Avant tout propos, je rends grâce à Dieu le tout puissant, le Tout-miséricordieux, le Très miséricordieux et l'omnipotent de m'avoir donné longue vie, la santé et la chance en ce moment difficile de covid-19 d'arriver au bout de ce master. Alhamdoulillah !

Ensuite, je voudrai adresser mes sincères remerciements pour le soutien et l'accompagnement sans faille de toutes ces institutions ainsi que leurs personnels et plus particulièrement avec une mention spéciale à leurs chefs dont j'ai bénéficié grâce à eux cet atout pour venir faire le master :

- L'Etat tchadien ;
- Ministère de la Santé Publique et de la solidarité nationale du Tchad ;
- Ministère de la fonction publique, de l'Emploi et de la Concertation sociale du Tchad ;
- Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique et de l'innovation du Tchad ;
- La Coordination du PNLP/ TCHAD ;
- La Coordination du PALAT/PNUD/TCHAD ;
- La direction de DELGEME/Mali ;
- La direction du MRTC/Mali ;
- La Faculté de Pharmacie de l'Université des Sciences des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB) /Mali ;
- La coordination de master de la Faculté de Pharmacie de l'USTTB /Mali ;
- La direction de CICM/Mali ;
- A mon Directeur de mémoire Pr. Abdoulaye DJIMDE du Mali ;
- A mon superviseur et Co-Directeur Dr Souleymane DAMA du Mali ;
- A tous le corps Professoral du Master (Mali, Burkina Faso, Sénégal, Tchad, France, etc...);
- Et à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de cette étude.

Recevez de tout mon cœur tous les vœux utiles et tous les respects que l'on peut formuler à votre égard.

INTRODUCTION

Introduction

Le paludisme représente un problème majeur de santé publique et sur le développement en Afrique. Selon le rapport mondial sur le paludisme 2020, 241 millions de cas de paludisme ont été rapportés dans le monde et le nombre de décès a atteint 627 000 cas(1). La région Afrique concentre en elle seule les 96% des cas des décès mondiaux dont 80% des cas ont continué à toucher les enfants de moins de 5 ans (1).

Ces 15 dernières années ont été marquées par des progrès sans précédent accomplis dans la lutte contre le paludisme dans le monde. Outre les baisses importantes dans la morbidité et la mortalité imputables au paludisme obtenues depuis 2000, 17 pays ont éliminé la maladie (à savoir qu'aucun cas autochtone n'a été enregistré pendant trois années ou plus), dont six pays ont été certifiés exempts de la maladie par l'OMS. Ces progrès ont suscité de nouveaux débats concernant l'objectif ultime de l'éradication mondiale du paludisme. Dans ce contexte, il est urgent que l'OMS clarifie la position de l'Organisation concernant l'objectif d'éradication du paludisme (2). En Afrique subsaharienne, malgré que de nombreuses stratégies ont été mises en œuvre entre autres l'utilisation généralisée des moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (3), le traitement préventif intermittent chez la femme enceinte (4) et la chimio prévention du paludisme saisonnier chez les enfants de 3 à 59 mois (5), l'élimination et l'éradication du paludisme restent toujours d'actualité. Cette élimination est retardée en Afrique subsaharienne non seulement pour des raisons économiques, mais aussi entre autres, à cause de l'apparition et du développement de la résistance de *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) aux antipaludiques et des anophèles vecteurs aux insecticides.

Bien que l'ensemble de la population soit exposé au risque de contracter le paludisme, les groupes les plus vulnérables sont les femmes enceintes et les enfants de moins de 5 ans. Afin de protéger les jeunes enfants contre ce fléau, l'Organisation Mondiale de la Santé a, dans sa recommandation de mars 2012, exhorté les pays africains de la sous-région du sahel l'adoption de la nouvelle stratégie qu'est la Chimio prévention du Paludisme Saisonnier (CPS). Cette stratégie consiste à administrer une combinaison de médicaments antipaludiques (à dose thérapeutique) durant la saison où le risque lié à la transmission est le plus élevé. Les médicaments recommandés pour cette stratégie sont une combinaison de Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP) et d'Amodiaquine (AQ) pour un effet actif d'environ 28 jours après leur administration (4). C'est ainsi que la CPS a été adoptée et incluse dans le plan stratégique de

tous les Programmes Nationaux de Lutte contre le Paludisme et a permis de réduire la parasitémie et le paludisme clinique chez les enfants des pays concernés (6).

A nos jours, la combinaison SP plus AQ a toujours conservé son efficacité dans les zones où la CPS est mise en œuvre. Cependant, se souvenant de la résistance des parasites du paludisme à la chloroquine (7) et de la propagation de la résistance à l'actuel pilier du traitement antipaludique qu'est l'artémisinine et ses dérivées (8), il est donc urgent et indispensable de renforcer les systèmes actuels de surveillance de l'émergence et de la propagation de la résistance de *P. falciparum* à la combinaison SP plus AQ.

La résistance de *P. falciparum* à la SP plus AQ anéantirait les années d'efforts consacrés à la recherche de l'élimination du paludisme en Afrique subsaharienne. En effet, selon certains auteurs, la CPS avec SP plus AQ peut augmenter la pression médicamenteuse et entraîner la sélection des marqueurs moléculaires de résistance à la SP et/ou l'AQ (9). Les mutations des codons (51, 59 et 108) du gène *Pfdhfr* et des mutations des codons (437 et 540) du gène *Pfdhps* sont connues comme étant de bons indicateurs de résistance à la SP (10,11), et des rapports récents indiquent qu'une double mutation *Pfcr1* et *Pfmdr1* est un bon marqueur de résistance à l'AQ (12,13).

Au Tchad en 2020, avec 1 055 819 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 (14). En plus des pertes en vies humaines, le paludisme coûte cher en dépenses de santé publique au Tchad (15).

Afin de réduire le fardeau du paludisme subit par les enfants de la tranche d'âge 3-59 mois, le pays a mis en place par une note ministérielle du 08 février 2013, la CPS. Depuis la mise en œuvre de la CPS, il y a très peu d'études sur l'impact de cette stratégie sur la morbidité et la mortalité (16). Le but de notre travail était d'évaluer la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* à la SP plus AQ au Tchad.

Hypothèse de recherche

L'utilisation à large échelle de la Sulfadoxine-Pyriméthamine plus Amodiaquine contribuerait à la sélection des souches de *P. falciparum* résistantes à la SP plus AQ dans la population cible de la CPS.

Pour vérifier cette hypothèse, nous nous sommes fixés des objectifs suivants :

1. Objectifs de l'étude

1.1. Objectif général

Evaluer la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* à la SP plus AQ au Tchad.

1.2. Objectifs spécifiques

- Déterminer la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* à la SP plus AQ dans la population de moins de 5 ans au Tchad.
- Déterminer la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* à la SP plus AQ dans la population de 5 ans et plus au Tchad.
- Comparer les prévalences des marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* à la SP plus AQ de la population de moins de 5 ans et celle de 5 ans et plus au Tchad.

METHODOLOGIE

2. Méthodologie

2.1. Cadre d'étude :

L'étude s'est déroulée dans les 21 régions identifiées comme sites d'études répartis entre 9 zones sur le territoire du Tchad.

Zone1 : N'Djaména

Zone2 : Kanem, Lac Tchad et Barh El Gazal

Zone3 : Ennedi Est, Ennedi Ouest, Wadi Fira et Ouaddaï

Zone4 : Hadjer Lamis, Batha et Guéra

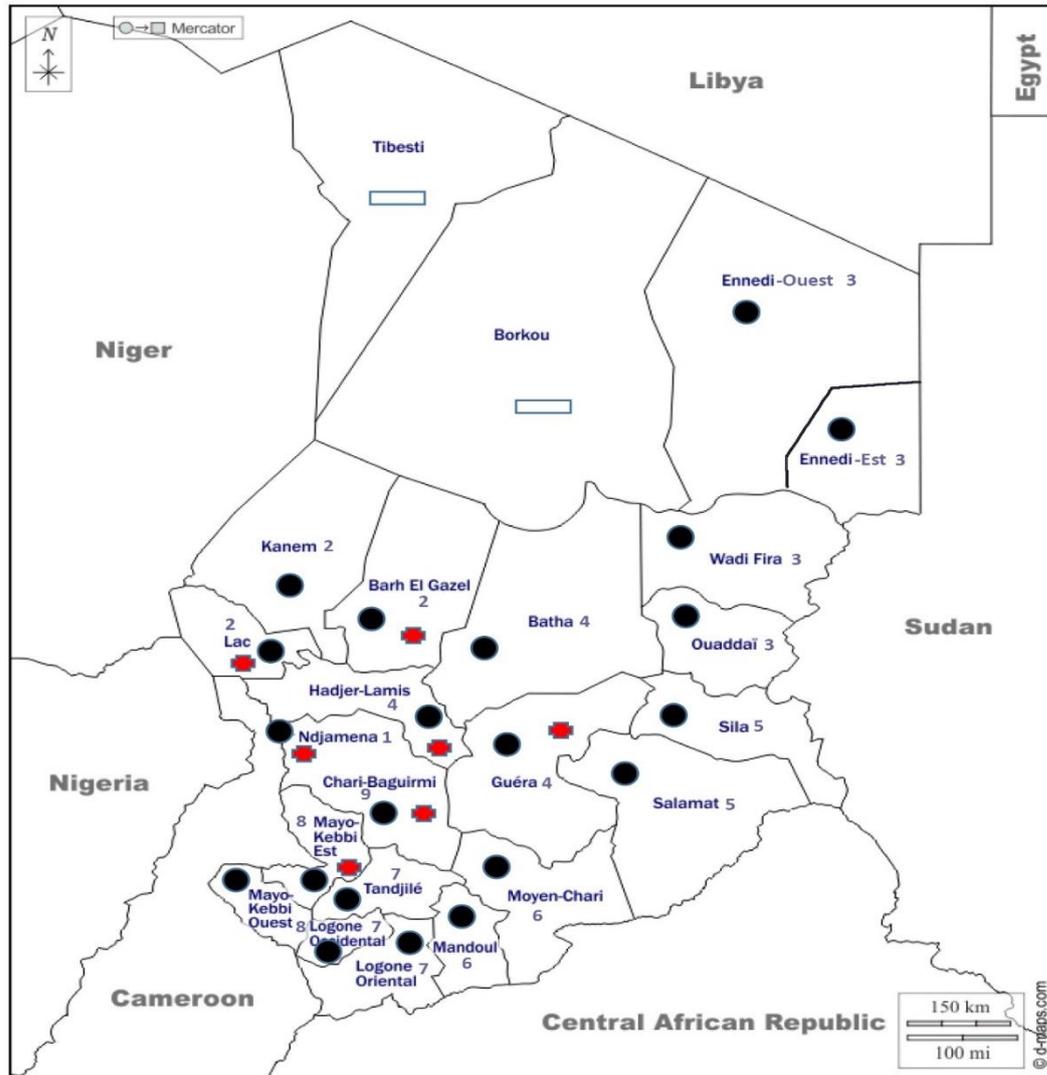
Zone5 : Salamat et Sila

Zone6 : Mandoul et Moyen Chari

Zone7 : Logone Oriental, Logone Occidental et Tandjilé

Zone8 : Mayo-Kebbi Est et Mayo-Kebbi Ouest

Zone9 : Chari Baguirmi



Source : https://d-maps.com/carte.php?num_car=4995&lang=fr

Figure 1 : Carte du Tchad représentant les différents sites d'études.

Légende :

- Région qui a servi l'ENIPT-2017
- ✚ Région faisant activité CPS
- Ni enquête, ni CPS

Remarque : Sur la carte, le numéro allant de 1 à 9 repartit dans les régions désigne les différentes zones et pour savoir l'appartenance de chaque région voir la partie du cadre d'étude section méthodologie.

2.2. Type d'étude

Nous avons effectué une étude transversale menée sur les indicateurs du paludisme au Tchad lors d'une enquête nationale.

2.3 Période d'étude

L'étude de terrain a été réalisée d'Octobre à Novembre 2017 et l'analyse moléculaire dans le laboratoire de MRTC de Mai à Octobre 2018.

2.4. Population d'étude

Nous avons travaillé sur les résultats PCR des échantillons récoltés au cours de l'enquête nationale. La tranche d'âge de la CPS est de 3 à 59 mois, comme les âges ont été catégorisés en < 5 ans et ≥ 5 ans dans la base de l'enquête nationale c'est pourquoi nous avons utilisé ces deux tranches d'âge.

2.4.1. Paramètres sociodémographiques

Les données sociodémographiques majeures utilisées lors de l'enquête étaient : l'âge, le lieu de résidence, la source de l'eau, le type de toilette utilisée, le type de logement, l'utilisation des grillages aux portes et fenêtres.

2.4.2. Réception des échantillons au laboratoire

Les confettis de cette enquête ont été réceptionnés au laboratoire de l'Unité d'Epidémiologie Moléculaire et de Chimiorésistance du Malaria Research and Training Center (MRTC). Ensuite, ils ont été triés conformément aux numéros d'identification de la base de données.

2.4.3. Echantillonnage

C'était un échantillon aléatoire qui nous a amené à tirer 111 échantillons par région sur les 26000 échantillons collectés dans les 21 régions (voir figure 1) en tenant compte des ressources disponibles.

Pour ce faire, un tri aléatoire du nombre de confettis par région, groupe d'âge et population cible a été effectué à l'aide du logiciel SPSS 16.0. En tout 2208 confettis ont été retenus

2.5. Test statistique :

Les données ont été saisies sur Excel et analysées sur R. Le Khi^2 a été utilisé pour la comparaison de proportion entre les allèles mutants et les allèles sauvages. Le seuil de significativité a été fixé $p < 0.05$.

2.6. Aspect éthique :

C'est une enquête conduite sous la direction du ministère de la santé publique avec la mise en place d'un comité de pilotage et un comité technique par un arrêté du ministre. Aussi, il faut

souligner que tous les participants ont donné leur consentement libre et éclairé avant l'inclusion dans l'enquête.

2.7. Méthodes moléculaires

2.7.1. Echantillon :

Le matériel biologique était constitué de sang prélevé sur papiers filtre buvard (Whatman) pour les analyses moléculaires.

2.7.2. L'extraction de l'ADN plasmodial :

La méthode d'extraction utilisée est le kit Qiagen®.

Matériel et réactifs

Il est nécessaire de réunir les matériels et réactifs suivants avant de procéder à l'extraction de l'ADN :

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

Mode opératoire

L'extraction de l'ADN plasmodial a été faite à l'aide du Kit QIAGEN Cat. No. 51306.

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

- Ouvrir le Kit Qiagen et reconstituer le Buffer AW1 et AW2 en ajoutant de l'éthanol pur ;
- Découper les languettes de confettis imbibés de sang et séché à l'aide de ciseaux et introduire dans les cryotubes labellés conformément au numéro de chaque confetti ;
- Ajouter 180 µl de Buffer ATL, s'assurer que les échantillons sont vraiment au fond de chaque tube, incubé à 85°C pendant 10 minutes, centrifuger brièvement ;
- Ajouter 20µl de protéinase K, mélanger à l'aide d'un vortex, incubé à 56°C pendant 1 heure ensuite centrifuger brièvement pour faire descendre le liquide qui se trouve sur la paroi du tube ; Cette étape correspond à la lyse des hématies.
- Ajouter 200 µl de Buffer AL, agiter à l'aide d'un vortex et incubé à 70°C pendant 10 minutes, centrifuger brièvement ;

NB : Ne jamais verser la protéinase K sur le Buffer AL selon le fabricant.

- ❑ Ajouter 200 µl d'éthanol (96 -100%), agiter au vortex et centrifuger brièvement, transférer tout le contenu du tube de 0,5 ou 1,5 ml dans la colonne munie de filtre tout en évitant les mousses, bien fermer la colonne et centrifuger à 8000 tours par minute pendant une minute. Retirer délicatement le tube contenant le filtre sans que le bout ne touche le liquide ;
- ❑ Prendre la mixture de l'étape N°6 et mettre dans le tube spin colonne, centrifuger à 8000 tours/mn pendant 1mn, transférer la membrane (spin) dans une autre colonne de 2ml.

NB : Au cas où le bout de spin touche le déchet liquide, il est préférable de reprendre la centrifugation ;

- ❑ Ajouter 500 µl de Buffer AW1 dilué avec de l'éthanol, centrifuger à 8000 tours par minute pendant une minute ensuite jeter le tube contenant le déchet, remplacer par une autre colonne stérile ;
- ❑ Ajouter 500 µl de Buffer AW2 dilué avec de l'éthanol, centrifuger à 1400 tours par minute pendant 3 minutes, transférer le spin dans les tubes correspondants au numéro d'identification du tube qui doit recueillir l'ADN ;
- ❑ Ajouter 150 µl de Buffer AE dans les tubes et incubé pendant 1mn à la température ambiante, centrifuger à 8000 tours par minute pour faire descendre l'ADN et conservé à -20° c (température selon laquelle l'ADN ne perdra pas sa propriété)

2.7.3. Les analyses moléculaires :

L'étude moléculaire a été réalisée au laboratoire de l'Unité d'Epidémiologie Moléculaire et de Chimiorésistance du Malaria Research and Training Center (MRTC). L'analyse moléculaire a été réalisée en utilisant la méthode RFLP (17). Pour les marqueurs moléculaires de résistance à la Sulfadoxine-Pyrimétamine les mutations d'intérêt étaient sur les codons 59 du gène *Pfdhfr* et les codons 437 et 540 du gène *Pfdhps*. Quant à l'Amodiaquine, les mutations d'intérêt sur les codons 86 du gène *Pfmdr1* et le codon 76 du gène *Pfcr1*.

Après l'extraction, nous avons procédé à l'amplification, à la digestion avec les enzymes de restriction. Ensuite on a interprété les photographies de l'ensemble de gels.

2.7.3.1. 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.

2.7.3.2. Amplification de l'ADN plasmodial :

▪ **Matériels**

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 1000 µl), racks, portoirs pour pipettes, Thermocycleur, poubelle.

▪ **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.

Solution tampon (PCR Buffer) :

La solution mère est concentrée à 10X, elle était fournie par les compagnies commerciales avec le Mg²⁺. Pour le stock de travail, on préparait des aliquotes concentrés à 7,5 mM de MgCl₂, 12,5mM MgCl₂ et 17,5mM MgCl₂.

Amorces

En général, elles venaient sous forme de poudre (lyophilisée) depuis la firme, à partir de la poudre, le stock de travail de 100 µM était préparé ; la concentration finale dans le tube réactionnel était de 1µM.

Taq Polymérase

C'est une enzyme isolée d'une bactérie thermophile d'après *Thermus aquaticus*. Cette bactérie est adaptée à la vie dans des sources d'eau chaude. Cette enzyme est responsable de la polymérisation en respectant la complémentarité des bases nucléotidiques.

▪ **Réactifs pour la révélation**

Solution de migration, TBE (Tris Borate EDTA) :

Pour composer une solution de stock de travail d'un litre avec une concentration de 5 fois ou 5X et avec un pH=8. On a pris 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), ensuite dissoudre dans de l'eau de-ionisée jusqu'à obtenir 1 litre. La solution finale de migration d'ADN était 0,5 fois concentrée soit 0,5X.

Colorant de migration :

C'est du bleu de bromophénol (BB). Ce colorant s'obtenait en mesurant 35ml de glycérol, 15ml d'eau de-ionisée et 0,125g de bleu de bromophénol.

Gel de migration :

La préparation est faite à partir de 2 g de poudre d'agarose dilué dans du TBE à 0,5X pour obtenir 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 ajoute un colorant fluorescent, le bromure d'éthidium (3ul), puis le gel est coulé dans un moule de migration contenant les peignes. Au bout de 30 min, le gel est prêt à être utilisé pour la migration.

Le Bromure d'Éthidium :

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

Marqueur de poids moléculaires :

Ce marqueur de poids moléculaires constituait la solution de référence. Pour la résuspension en solution des lyophilisats d'amorces, diluer 100µl de paires de bases de l'ADN dans 400µl d'eau stérile. Puis, ajouter 100µl du colorant bleu six fois concentré, pour former un mélange de 600µl.

Techniques

Nous avons procédé au génotypage de *Pfdhfr* et de *Pfdhps* respectivement au codon 59 et aux codons 437 et 540. C'est la méthode basée sur la restriction spécifique à l'allèle qui a été utilisée.

2.15.1. Détermination des polymorphismes aux codons 59 de *Pfdhfr*

✓ Première amplification

Au cours de cette première étape, nous avons réalisé la procédure ci-après (18) (19) :

- Identifier les tubes de 200 µl conformément aux numéros des confettis à traiter.
- Préparer le mélange des réactifs dans un tube de 1,5ml, en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction selon le tableau.
- Repartir dans chaque tube identifié 20µl du mélange réactionnel.
- Ajouter 5µl d'ADN extrait au Qiagen dans le tube correspondant.
- Centrifuger brièvement les tubes contenant le mélange réactionnel.
- Placé les tubes bien fermés dans le Thermocycleur pour l'amplification avec le programme approprié.

Couples d'amorces de la première amplification :

FR51-A : GCGCGCTAATAACTACACATTTA

FR51-B : CCCGGGCTCTTATATTTCAATTT

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

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

Pour un volume total de 25 µl, on ajoute dans chaque tube 5 µl de l'ADN extrait au Qiagen et 1 µl d'ADN+4 µl d'eau pour les témoins.

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

Étapes	Températures	Temps
1 Dénaturation initiale	95°C	5 min
2 Dénaturation	92°C	30 secs
3 Hybridation	45°C	30 secs
4 Elongation	65°C	45 secs
5 Nombre de cycle, 44 cycles		
6 Elongation finale	72°C	15 min
7 Fin du programme	4°C	Infini

Deuxième amplification :

De même que la première amplification, nous avons identifié les tubes de 200 µl conformément aux numéros des produits de la première amplification à traiter. Puis nous avons préparé le mélange dans un tube 1,5 ml en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction. Après nous avons reparti dans chaque tube identifié 24µl de la solution du mélange. Puis nous avons ajouté 1µl du produit de la 1 ère amplification dans le tube correspondant. Ensuite nous avons effectué une brève centrifugation des tubes. Les tubes bien fermés sont à la fin mis dans le

Thermocycleur pour l'amplification selon le programme approprié. Enfin, faire l'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% et Prendre de la photo du gel.

Couple d'amorces de la deuxième amplification :

FR51-D : CTAGGAAATAAAGGATATTACCATGG

FR59-D : ATTTTTCATATTTTGATTCATTACATATGTTGTAAGTGTAC

Tableau III: 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 µl
H2O	-	-	11,875
Buffer/ Mgcl ₂	5X/ 12,5 m	1X/ 2,5 mM	5
dNTPs	2 mM	200 µM	2,5
FR59-W	100 µM	1 µM	0,25
FR59-M	100 µM	1 µM	0,25
Taq polymérase	5U / µl	0,025U	0,125
Volume Total	-	-	20 µl

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

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

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

Etapes	Températures	Temps
1 Dénaturation initiale	95°C	2 min
2 Dénaturation	92°C	30 secs
3 Hybridation	45°C	30 secs
4 Elongation	65°C	30 secs
5 Nombre de cycle, 44 cycles		
6 Elongation finale	72°C	15 min
7 Fin du programme	4°C	Infini

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

Nous avons d'abord sélectionné les échantillons qui ont des bandes correctes de la 2^{ème} amplification. Puis nous avons numéroté des nouveaux tubes de 200 µl conformément aux numéros du produit de la deuxième amplification à traiter. Ensuite nous avons préparé le mélange des réactifs dans un tube 1,5 ml en fonction du nombre d'échantillons à traiter. Après nous avons reparti dans chaque tube identifié 15µl du mélange. Ensuite nous avons ajouté 5µl du produit de la deuxième amplification dans le tube correspondant. Puis nous avons brièvement centrifugé. En fin nous avons placé les tubes dans un Thermocycleur, l'incubateur, ou le bain marie, ou les plaques chauffantes. La digestion se fait à une température de 50°C pendant 6heures au minimum. Puis nous avons procédé à l'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% pendant au moins 30mn à 100V (volte). Finalement nous avons fait la révélation sous UV. Puis nous avons pris la photo du gel, et nous l'avons interprété.

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

Tableau V: Composition du Mélange réactionnel des codons 51 et 59 de *Pfdhfr*

Réactifs	Volume par réaction
H2O	12,6 µl
NE Buffer 2.1	2 µl
BsrGI	0,4 µl
Total	15 µl

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

Interprétation et validation des résultats :

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

Critères de validité du résultat de l'électrophorèse :

Conformité de la taille du produit de la digestion par rapport à celle attendue ;

L'absence de bandes au niveau des contrôles négatifs

Présence des bandes au niveau des contrôles positifs

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

L'enzyme de restriction utilisée BsrGI coupe les souches de génotypes sauvages en 65 et 36 pb.

Les échantillons avec des bandes de même taille que le témoin sensible correspondent aux souches sauvages.

Les échantillons avec des bandes de même taille que le témoin résistant correspondent aux souches mutantes.

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

2.15.2. Détermination des mutations ponctuelles aux codons 437 et 540 au niveau de dihydroptéroate synthétase.

Première amplification :

La méthode de préparation des réactifs 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'extension qui se fait à 65°C pendant 45 sec.

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 :

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'extension qui se fait à 65°C pendant 45 secondes.

Couple d'amorces de la deuxième amplification :

Amorces spécifiques au codon 437 :

Amorce sens : PS400-D1 : TGTTCAAAGAATGTTTGAAATGA

Amorce anti-sens : PS400-D2 : CCATTCTTTTTGAAATAATTGTAAT

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

Amorces spécifiques au codon 540 :

Amorce sens : PS500-D1 : GCGCGCGTTCTAATGCATAAAAGAGG

Amorce anti-sens : PS500-D2 : CGGGTAAGAGTTTAATAGATTGATCAGCTTTCTTC

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

Digestion enzymatique du produit de la 2ème amplification :

Même procédure 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

Même que précédemment en termes des critères de validité et de jugement sauf que les éléments suivants changent :

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.

Détermination du génotype des codons 86 et 76 au niveau de *Pfmdr1* et *Pfcr1* respectivement.

Première amplification

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

Couples d'amorces de la première amplification :

Amorces spécifiques au codon 86 de *Pfmdr1* :

Amorce sens MDR-1 : ATGGGGTAAAGAGAGAAAGA

Amorce anti-sens MDR-2 : AACGCAAGTAATACATAAAGTCA

Amorces spécifiques au codon 76 de *Pfcr1* :

Amorce sens P1 : CCGTTAATAATAAATACACGCAG

Amorce anti-sens P2 : CGGATGTTACAAAACCTATAGTTACC

Deuxième amplification

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

Couple d'amorces de la deuxième amplification :

Amorces spécifiques au codon 86 de *Pfmdr1* :

Amorce sens : MDR-3 : TGGTAACCTCAGTATCAAAGAA

Amorce anti-sens : MDR-4 : ATAAACCTAAAAAGGAACTGG

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

Amorces spécifiques au codon 76 de *Pfcrt* :

Amorce sens : D1 : TGTGCTCATGTGTTTAACTT

Amorce anti-sens : D2 : CAAAACCTATAGTTACCAATTTTG

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

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

Pour faire la digestion, nous avons utilisé la même procédure que celle qui a été utilisée pour la digestion des *Pfdhfr* triples. Les éléments qui varient sont les enzymes qui sont représentées et la température de digestion qui est à 50°C pour l'enzyme APO I pour le *Pfcrt* et l'enzyme AFL III pour le *Pfmdr1*.

Interprétation et validation des résultats :

Les conditions 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.

RESULTATS

3. Résultats

L'étude a porté sur les participants âgés de moins de 5 ans et 5 ans et plus pendant la période de l'enquête de 2017. Elle s'est déroulée dans les 21 régions identifiées comme sites d'études répartis entre 9 zones sur le territoire du Tchad.

3.1 Résultats socio-démographiques

Tableau VI: répartition des participants selon les tranches d'âge

Tranches d'âge	Effectif	Pourcentage
<5ans	963	45,4
5ans et plus	1157	54,6
Total	2120	100

Les enfants de moins de 5 ans représentait 45,4% de notre population d'étude tandis que la tranche d'âge de 5 ans et plus représentait à 54,6%.

Tableau VII: répartition des participants en fonction des zones

Zones		Effectif	Pourcentage
<i>Sahélienne</i>	Zone2	41	1,9
	Zone3	62	2,9
	Zone4	51	2,5
<i>Soudanienne</i>	Zone1	91	4,3
	Zone5	314	14,8
	Zone6	355	16,7
	Zone7	472	22,2
	Zone8	402	18,9
	Zone9	335	15,8
Total		2123	100

Les zones soudaniennes sont beaucoup plus représentées en effectif que les zones sahéliennes.

3.2 Etude moléculaires

Tableau VIII: prévalence des allèles mutants du codon 59 du gène *Pfdhfr* selon les classes d'âge

Allèles <i>dhfr59</i>	<5ans		5 ans et plus		p
	n	%	n	%	
Sauvage	25	2,9	33	2,9	0,99
Mutant	849	97,1	1119	97,1	
Total	874	43,1	1152	56,9	

La prévalence des allèles mutants de *Pfdhfr59* était identique dans les deux tranches d'âges (97,1%) avec une valeur de $p= 0,99$.

Tableau IX: prévalence des allèles mutants du codon 437 du gène *Pfdhps* selon les classes d'âge

Allèles <i>dhps437</i>	<5ans		5 ans et plus		p
	n	%	n	%	
Sauvage	566	61,3	736	65,2	0,06
Mutant	358	38,7	393	34,8	
Total	924	45	1129	55	

La prévalence des allèles mutants de *Pfdhps437* était de 38,7% et 34,8% respectivement chez les sujets de moins de 5 ans et les sujets de 5 ans et plus avec une valeur de $p= 0,06$.

Tableau X : prévalence des allèles mutants du codon 540 du gène *Pfdhps* selon les classes d'âge.

Allèles <i>dhps540</i>	<5ans		5 ans et plus		p
	n	%	n	%	
Sauvage	796	87	1010	91,9	
Mutant	119	13	89	8,1	< 0,001
Total	915	45,4	1099	54,6	

Pour les mutations du codon 540 du gène *Pfdhps*, nous avons constaté que la prévalence des allèles mutants des isolats dans la tranche d'âge de moins de 5 ans (13%) était plus élevée que celle de la tranche d'âge de 5 ans et plus (8,1%) avec une différence statistiquement significative ($p < 0,001$).

Tableau XI : prévalence des allèles mutants du codon 86 gène *Pfmdr1* selon les classes d'âge.

Allèles <i>Pfmdr1_86</i>	<5ans		5 ans et plus		p
	n	%	n	%	
Sauvage	620	74,5	919	83,2	
Mutant	212	25,5	186	16,8	< 0,001
Total	832	43	1105	57	

De ce tableau, ressort que la prévalence des allèles mutants du codon 86 de *Pfmdr1* des isolats dans la tranche d'âge de moins de 5 ans (25,25%) était statistiquement plus élevée que celle des sujets d'âge de 5 ans et plus (16,8%) ($p < 0,001$).

Tableau XII: prévalence des allèles mutants du codon 76 du gène *Pfcr76* selon les classes d'âge

Allèles <i>Pfcr76</i>	<5ans		5 ans et plus		p
	n	%	n	%	
Sauvage	525	59,8	692	63,9	
Mutant	353	40,2	391	36,1	0,0627
Total	878	44,8	1083	55,2	

La prévalence des allèles mutants de *Pfcr76* de la tranche d'âge de moins de 5 ans (40,2%) était comparable à celle de la prévalence de la tranche d'âge des 5 ans et plus (36,1%) avec un $p = 0.0627$.

DISCUSSION

4. Discussions et commentaires :

Le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) du Tchad a entrepris une enquête transversale de prévalence des marqueurs moléculaires de la résistance à la Sulfadoxine-Pyriméthamine et à l'Amodiaquine sur l'ensemble du territoire du Tchad dénommée « Enquête Nationale sur les Indicateurs du Paludisme au Tchad en 2017 ». L'étude s'est déroulée dans les 21 régions identifiées comme sites d'études répartis entre 9 zones sur le territoire. Le but de notre présent travail était d'évaluer la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* à la SP plus AQ au Tchad dans le contexte de l'implémentation de la CPS.

Nous avons recherché s'il y avait une sélection des marqueurs moléculaires de résistance dans la population cible de la CPS comparée aux autres tranches d'âges.

La population cible de la CPS de notre étude était des enfants de moins de 5 ans (45,4%) et les autres tranches d'âge étaient de (54,6%).

4.1 Les marqueurs de résistance à la Sulfadoxine-Pyriméthamine et à l'Amodiaquine :

La méthode RFLP a été utilisée pour la recherche des allèles mutants des gènes *Pfdhps*, *Pfdhfr*, *Pfcrt* et *Pfmdr1*

4.1.1. Prévalence de l'allèle mutant du codon 540 du gène *Pfdhps*

La prévalence de l'allèle mutant 540 du *Pfdhps* était faible, elle était inférieure au seuil de 50% défini par l'OMS pour l'utilisation de la SP dans une zone d'intervention. Cette prévalence était statistiquement plus élevée dans la tranche d'âge de moins de 5 ans avec 13% comparée à la prévalence de 8,1% de la tranche d'âge de 5 ans et plus ($p < 0.001$). Ces résultats sont supérieurs à ceux d'une étude conduite au Cameroun par Tuedom A.G.B et al., en 2021, qui a trouvé une prévalence de 0,33% de l'allèle mutant 540 de *Pfdhps* (20). Cette différence avec l'étude du Cameroun pourrait s'expliquer par l'inachèvement de l'implémentation de la CPS dans cette région. Nos résultats étaient également supérieurs à ceux trouvés au Mali et au Sénégal respectivement par Mahamar A. et al., en 2022 avec 4% de prévalence (21) et par Lo A.C. et al., en 2013 qui n'ont trouvé aucune mutation (22). Ces différences pourraient s'expliquer par une différence géographique entre les populations parasitaires ou par une utilisation inappropriée de la Sulfadoxine-Pyriméthamine au Tchad.

4.1.2. Prévalence de l'allèle mutant du codon 437 du gène *Pfdhps* selon les classes d'âge

La prévalence de l'allèle mutant de *Pfdhps*437 était de 38,7% et 34,8% respectivement chez les sujets de moins de 5 ans et les sujets de 5 ans et plus avec une valeur de $p = 0,0655$.

Nos résultats étaient largement en dessous des résultats de l'étude du Sénégal où la prévalence de l'allèle mutant *Pfdhps437* était élevée dans les villages CPS avec une prévalence de l'allèle mutant *Pfdhps437* qui était de 87,5 % contre une prévalence de 67,56% dans les villages témoins (22). Cette différence de prévalence entre les résultats de ces deux études pourrait s'expliquer par le niveau relativement faible de la couverture de la CPS au Tchad au moment de cette étude comparée au Sénégal qui serait beaucoup plus en avance dans l'implémentation de la CPS.

4.1.3. Prévalence de l'allèle mutant du codon 59 du gène *Pfdhfr*

La prévalence de l'allèle mutant de *Pfdhfr59* était comparable dans les deux tranches d'âges (97,1%) avec un $p=0,996$.

Nos résultats étaient largement supérieurs à la prévalence de 30% d'allèle mutant *Pfdhfr59* trouvée au Tchad par Souleymane I.M. et al., en 2018 (23). Cette différence de prévalence dans le même pays pourrait s'expliquer par la petite taille d'échantillons utilisée dans cette étude, car ces auteurs ont travaillé juste sur 30 échantillons et dans une seule région, alors que notre étude a porté sur 2208 échantillons à l'échelle nationale.

Cependant, nos résultats étaient comparables aux résultats de l'étude faite au Mali par Mohamar A et al., en 2014, qui a révélé une prévalence de 98,8% d'allèle mutant du *Pfdhfr59* (21). Cette similarité des résultats pourrait s'expliquer par le fait que le Mali et le Tchad auraient un niveau comparable d'implémentation de la CPS.

4.1.4. Prévalence de l'allèle mutant du codon 76 du gène *Pfcr7*

La prévalence de 40% de l'allèle mutant de *Pfcr76* dans la tranche d'âge de moins de 5 ans était comparable à celle de la prévalence de 36,1% de la tranche d'âge des 5 ans et plus avec une valeur de $p = 0.0627$.

Cette prévalence était comparable à celle de 30% trouvée par Tuedom A.G.B et al., en 2021 au Cameroun (20).

Par contre, la prévalence d'allèle mutant de la population cible de notre étude était le double de la prévalence de 20% trouvée dans la population cible d'une étude menée au Burkina Faso par Sondo P. et al., en 2021 (24). Cette élévation de la prévalence de l'allèle mutant *Pfcr76* au Tchad et au Mali par rapport au Burkina Faso pourrait s'expliquer par l'utilisation élevée des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine impliquant les molécules partenaires comme la pipéraquline ou l'amodiaquine qui sont des analogues structuraux de la chloroquine pouvant entraîner une sélection croisée de l'allèle mutant *Pfcr76*.

4.1.5. Prévalence de l'allèle mutant du gène *Pfmdr1*

La prévalence de 25,25% de l'allèle mutant du codon 86 du *Pfmdr1* dans la tranche d'âge de moins de 5 ans était plus élevée que celle de 16,8% des sujets d'âge de 5 ans et plus avec une différence statistiquement significative ($p < 0,001$).

Nos résultats étaient en dessous de la prévalence de 50% trouvée au Cameroun par Tuedom A.G.B et al., en 2021 (20), mais comparables à la prévalence de 20% trouvée par Lo A. C. et al., en 2013 au Sénégal (22).

Cette baisse de prévalence des allèles mutants du gène *Pfmdr1* au Tchad et au Sénégal par rapport à celle du Cameroun pourrait s'expliquer par la pression médicamenteuse liée à la luméfantine qui est connue pour son effet sélectif des allèles sauvages du *Pfmdr1*. L'augmentation de la prévalence de l'allèle mutant du codon 86 de *Pfmdr1* dans la population cible pourrait s'expliquer par le fait que cette tranche d'âge présente des concentrations résiduelles des médicaments de la CPS donc une possibilité de sélection de cet allèle.

CONCLUSION

5. Conclusion :

Les résultats de cette étude ont montré une sélection des allèles mutants du codon 540 du gène *Pfdhps* et du codon 86 du gène *Pfmdr1* plus élevée dans la population cible de la CPS comparée aux autres tranches d'âges.

RECOMMANDATIONS

Recommandations :

Au terme de cette étude, nous voudrions formuler les recommandations suivantes :

➤ **Au Ministère de la Santé Publique et de la Solidarité Nationale :**

Allouer un fond de la recherche pour le suivi de l'évolution des marqueurs moléculaires de résistance aux médicaments de la CPS ;

➤ **Au Programme National de Lutte contre le Paludisme :**

Mettre des mesures de surveillance pour continuer à évaluer l'évolution des marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* aux médicaments de la CPS.

➤ **Aux partenaires techniques et financiers :**

Aider le PNLP à se doter d'un laboratoire de biologie moléculaire pour mener à bien les activités de recherche dans le domaine du paludisme sur ses différents sites sentinelles et les études sur les enquêtes nationales.

REFERENCES

Références

1. OMS. Rapport 2021 sur le paludisme dans le monde. 2021.
2. Organisation mondiale de la santé. Conseil executif, cent quarante et unieme session. EB141/3. 2017.
3. Global Malaria Programme. Achieving universal coverage with long-lasting insecticidal nets in malaria control. 2014;2014(March):4–6.
4. World Health Organization. Global Malaria Programme. Updated WHO Policy Recommendation Intermittent Preventive Treatment of malaria in pregnancy using Sulfadoxine- Pyrimethamine (IPTp-SP). 2012;(October):3–4.
5. Organisation mondiale de la santé. Programme Mondial de Lutte Antipaludique. Plan mondial pour la gestion de la resistance aux insecticides. 2012;2011:1–4.
6. Baba E, Hamade P, Kivumbi H, Marasciulo M, Maxwell K, Moroso D, et al. Effectiveness of seasonal malaria chemoprevention at scale in west and central Africa: an observational study. Lancet. 2020 Dec 5;396(10265):1829–40.
7. 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 [Internet]. 2001 Jan 25 [cited 2015 May 25];344(4):257–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11172152>
8. Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, Suon S, et al. Spread of artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. N Engl J Med [Internet]. 2014;371(5):411–23. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4143591&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
9. Maiga H, Lasry E, Diarra M, Sagara I, Bamadio A, Traore A, et al. Seasonal Malaria Chemoprevention with Sulphadoxine-Pyrimethamine and Amodiaquine Selects Pfdhfr-dhps Quintuple Mutant Genotype in Mali. Sullivan DJ, editor. PLoS One [Internet]. 2016 Sep 23 [cited 2019 Apr 8];11(9):e0162718. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0162718>
10. Lenthe M Van, Meulen R Van Der, Lassoovski M, Ouabo A, Bakula E. Markers of sulfadoxine – pyrimethamine resistance in Eastern Democratic Republic of Congo ; implications for malaria chemoprevention. Malar J. 2019;1–9.
11. Moyeh MN, Njimoh DL, Evehe MS, Ali IM, Nji AM, Nkafu DN, et al. Effects of Drug

- Policy Changes on Evolution of Molecular Markers of Plasmodium falciparum Resistance to Chloroquine, Amodiaquine, and Sulphadoxine-Pyrimethamine in the South West Region of Cameroon. Malar Res Treat [Internet]. 2018 [cited 2022 May 21];2018:7071383. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29854394>
12. Duraisingh MT, Jones P, Sambou I, Von Seidlein L, Pinder M, Warhurst DC. The tyrosine-86 allele of the pfmdr1 gene of Plasmodium falciparum is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin. Mol Biochem Parasitol. 2000;108:13–23.
 13. Danquah I, Coulibaly B, Meissner P, Petruschke I, Müller O, Mockenhaupt FP. Selection of pfmdr1 and pfcrt alleles in amodiaquine treatment failure in north-western Burkina Faso. Acta Trop. 2010 Apr;114(1):63–6.
 14. Minist T, Mondiale PO. IMPACT SOCIO-ECONOMIQUE DU PALUDISME AU TCHAD EN 2002. 2003;2002(4).
 15. Yandäi FH, Moundine K, Djoumbe E, Boulotigam K, Moukenet A, Kodindo ID, et al. Perception de risques du paludisme et utilisation des moustiquaires au Tchad. Int J Biol Chem Sci. 2017;11(1):228.
 16. Richardson S, Moukenet A, Diar MSI, de Cola MA, Rassi C, Counihan H, et al. Modeled impact of seasonal malaria chemoprevention on district-level Suspected and confirmed malaria cases in Chad based on routine clinical data (2013–2018). Am J Trop Med Hyg. 2021 Dec 1;105(6):1712–21.
 17. Duraisingh MT, Curtis J, Warhurst DC. Plasmodium falciparum: Detection of polymorphisms in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes by PCR and restriction digestion. Exp Parasitol. 1998;89(1):1–8.
 18. Plowe C V., Cortese JF, Djimde A, Nwanyanwu OC, Watkins WM, Winstanley PA, et al. Mutations in Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine- sulfadoxine use and resistance. J Infect Dis. 1997;176(6):1590–6.
 19. Basco LK, Ringwald P. Molecular epidemiology of malaria in Yaounde, Cameroon. VI. Sequence variations in the Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene and in vitro resistance to pyrimethamine and cycloguanil. Am J Trop Med Hyg. 2000;62(2):271–6.
 20. Tuedom AGB, Sarah-Matio EM, Moukoko CEE, Feufack-Donfack BL, Maffo CN,

- Bayibeki AN, et al. Antimalarial drug resistance in the Central and Adamawa regions of Cameroon: Prevalence of mutations in *P. falciparum* crt, Pfm_{dr1}, Pfdhfr and Pfdhps genes. PLoS One. 2021 Aug 1;16(8 August).
21. Mahamar A, Sumner KM, Levitt B, Freedman B, Traore A, Barry A, et al. Effect of three years' seasonal malaria chemoprevention on molecular markers of resistance of Plasmodium falciparum to sulfadoxine-pyrimethamine and amodiaquine in Ouelessebouyou, Mali. Malar J. 2022 Dec 1;21(1).
 22. Lo AC, Faye B, Ba EH, Cisse B, Tine R, Abiola A, et al. Prevalence of molecular markers of drug resistance in an area of seasonal malaria chemoprevention in children in Senegal. Malar J. 2013;12(1).
 23. Souleymane IM, Toure OA, Mbanga D et al. Prevalence of Sulfadoxine–pyrimethamine resistance-associated mutations in dhfr and dhps gene of Plasmodium falciparum isolates collected in Pala west region of Chad. African J Parasitol Res. 2018;5 (1):7.
 24. Sondo P, Bihoun B, Kabore B, Tahita MC, Derra K, Rouamba T, et al. Polymorphisms in plasmodium falciparum parasites and mutations in the resistance genes pfcr_t and pfmdr₁ in nanoro area, burkina faso. Pan Afr Med J. 2021;39.