

**MINISTRE DES ENSEIGNEMENTS
SECONDAIRE, SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

REPUBLIQUE DU MALI

Un Peuple – Un But – Une Foi





**FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTO -
STOMATOLOGIE**

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2008-2009

N°...../

TITRE :

**Comparaison de deux techniques moléculaires
de surveillance de la chimiorésistance de
*Plasmodium falciparum***

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 12 / 01/2009

Devant le jury de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie

Par Mr. Antoine DARA

Pour obtenir le Grade de Docteur en Pharmacie

(DIPLOME D'ETAT)

Jury

PRESIDENT : Pr. Issa TRAORE

MEMBRE : Dr. Bouréma KOURIBA

CO-DIRECTEUR DE THESE : Dr. Abdoulaye DJIMDE

DIRECTEUR DE THESE : Pr. Ogobara K. DOUMBO

DEDICACES

A mon père,

Papa Amaga Honoré
Pour l'éducation
Pour l'amour

En témoignage de ma profonde affection
Je te remercie papa pour l'aide que tu n'as cessé de m'apporter et pour
les valeurs de courage et de persévérance que tu nous as inculqué.
Ce travail est le tien.

A ma mère,

Maman Yirbè Bernadette Dougnon

Pour ton amour,

Pour tous tes sacrifices,
Ta patience

Pour toute l'affection maternelle dont tu as fait preuve

En témoignage de mon éternelle reconnaissance.

A mes frères et sœurs :

Catherine, Jean, Marc, Marie, Marcel, Pascaline, Benjamin, Abel
Je sais la fierté que vous affichez à mon égard, je tiens donc à vous
exprimer mes sentiments fraternels.

Amour fraternel !

REMERCIEMENTS

*A l'Eternel mon Seigneur et mon Dieu
Louange et Gloire à Toi Seigneur Jésus.*

A mon Oncle Andiè Dara et famille

Vous m'avez appris à marcher pour la toute première fois sur le chemin de l'école.
Merci pour tout.

A Oncle Drissa Konaté et famille

Votre fils adoptif que je suis vous dit merci de tout cœur.
Les simples mots ne pourront jamais exprimer ce que vous avez fait pour moi.
Ce travail est le votre.
Que le Dieu tout Puissant vous le paye au centuple.

En témoignage de mon respect et ma profonde gratitude

A la famille Inguère Dolo

A mon Cousin Pierre Dara et famille
En témoignage de mon amour, de mon profond respect et de ma reconnaissance.

A oncle Andjouro Dara à Koundou A papa Jean Dougnon et famille à Koro

En témoignage de mon amour et de ma profonde admiration
Que Dieu vous protège et vous prête bonne santé et longue vie.

Je voudrais dire merci à :

Georges Dara, Abinem Dara, Etienne Dougnon, Esaie Dara, Paul Dara, Marc Atoy,
Joseph Basile, Joseph Jean, Jean André, Yaya Dara, Philippe Dougnon et sa famille, Abbé
Dieudonné Somboro, Sœur Lucie Dougnon, Sœur Suzanne Dougnon, Sœur Marcelle
Dara, l'abbé Gérard BLAYAC et à la sœur Julia Immaculada Rodrigo Moro
Charles Dara, Philippe Dara, Mohamed Keita, Salif Koné, Aly Guindo, Adama Camara
dite Bebelles, Fanta Goita.

A tous mes cousins et à toutes mes cousines,
A tous mes neveux et à toutes mes nièces,
A mes tantes
A mes oncles
A mes camarades d'enfance.
Grand merci

À tous mes Maîtres de l'enseignement primaire, de l'enseignement secondaire, de
l'externat et de l'internat

À tous ceux qui ont participé à ma formation

Que Dieu vous bénisse

A mes camarades de promotion 1999-2004

Merci pour les moments passés ensemble
Merci pour votre aide et soutien.

A la communauté catholique estudiantine du Point « G »

A la Communauté des élèves et étudiants croyants CEC

A GINNA DOGON de la FMPOS

A l'association des élèves et étudiants ressortissants de Koundou et Sympathisants

Au COJEP

Merci pour les leçons de la vie

A mes frères et sœurs

et amis de la "Cité de Dieu": Dr Kodio Boureima, Dr Amadou Niangaly, Dr Tolo Yousseuf, Dr Sanou Fainand, Dr Dougnon Abdias, Dr sadou Ongoiba, Mr Zakari Saye, Victor Dara, Mr Fidèle Diarra, Mlle Fatoumata Diallo, Marie Thera, Sylla Babaeya, Coulou, Ibrahim, Adama Dissa et les cadets

Djènèba Fofana, Bernadette Coulibaly, Anne-Marie Coulibaly, Nana Poudiogo
Je voulais vivre ce temps à la cité pour l'éternité! Mais...! Comme on le dit à chaque époque son temps. Je vous dis encore merci.

A mes encadreurs du MRTC/DEAP.

Aux camarades thésards du MRTC/DEAP

Merci pour l'initiation à la recherche.

A la famille MEDRU:

Dr Djimdé Abdoulaye, Dr Beavogui Abdoul Habib, Dr Wélé Mamadou, Dr Tékéké Mamadou, Dr Fofana Bakary, Dr Hamma Maïga, Dr Sidibé Bakary, Dr Cheick Papa Oumar Sangaré, Dr Touré Dinkorma Ouologuem, Dr Souleymane Dama, Dr Oumar Bila Traoré, Dr Oumar Yattara, Dr Koumaré Sekou, Mr Touré Sekou, Mlle Koné Aminatou, Mr Dembélé Demba, Mr Sanago Kassoum, Mr Traoré Zoumana Isaac, Mr Niangaly Hamidou, Mr Togo Amadou, Mr Kodio Aly, Diallo Nouhoum, Oumou Maiga, Breanna Sky Barger

Plus qu'une équipe de recherche nous sommes une famille.

Merci pour m'avoir accueilli dans cette famille.

A Benjamin Poudiogo, Jean-Baptiste Guindo, Karim Guindo.

En témoignage de mon amitié sincère.

Aux familles Dara, Dougnon, Saye, Dolo,
Un grand merci

Mr Mamadou Ba, Dr Amed Ouattara, Dr Renion Saye, Dr Agnes Guindo, Seidina Diakité, Dr Karim Traoré, Dr Dara Nianwalou, Dr Bruno Dakoua, Dr Moise Somboro, Dr Sory Ouologuem, Dr Etienne Togo, Dr Housseini Dolo, Dr Marc Guindo, Dr Saidou Balam, Kounidiou Dolo, Dr Ibrim Guindo, Dr Oumar Dolo, Mr Abdoul Dolo
En témoignage de ma profonde gratitude.

Je tiens à remercier Dr Arama Dominique, Dr Koné Kadiatou, Dr Dama Aminata Niaré, Dr Mamadou Tolo, Dr Oumar Sididé, Dr Mamou Diabaté, Dr Ousmane Kanté, Dr Brehima Diallo pour les connaissances partagées lors des séances d'exercices.

A tout le personnel du MRTC/DEAP un grand merci

Merci à tous ceux qui ont de près ou de loin contribué à la réalisation de ce travail.

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A notre maître et président du jury

Le Professeur Issa TRAORE

- *Professeur de Radiologie et d'Imagerie médicale à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.*
- *Ancien doyen de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.*
- *Ancien Directeur Général de l'Hôpital du point G*
- *Ancien Secrétaire Général du Conseil national de l'ordre des médecins du Mali*
- *Officier de l'ordre des Palmes académiques de la République française*
- *Président de la Société malienne d'Imagerie Médicale*

Cher maître, vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider le jury de ce modeste travail malgré vos multiples occupations. Nous avons apprécié votre très grande disponibilité, vos immenses qualités scientifiques, humaines et l'intérêt que vous portez à la formation de la génération future. Soyez rassuré cher maître de notre profond respect et de nos sincères remerciements.

A notre maître et juge

Le Docteur Bouréma KOURIBA, PharmD, PhD

Maître Assistant en Immunologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie,

Responsable d'Assurance Qualité au Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS)

Chercheur au Malaria Research and Training Center (MRTC).

Nous avons admiré la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail. Votre courtoisie et votre rigueur scientifique font de vous un maître apprécié. Nous avons bénéficié avec une grande attention, les cours que vous dispensez avec habileté.

Trouvez ici, cher maître, l'expression de notre profonde gratitude.

A notre Maître et Co-Directeur de thèse

Le Docteur Abdoulaye DJIMDE, PharmD, PhD

Maître Assistant en Microbiologie-Immunologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.

Responsable de l'Unité d'Epidémiologie Moléculaire et de la Chimiorésistance du MRTC

Encadrer n'est pas une tâche facile.

Sympathie, courage, détermination, simplicité et surtout compétence scientifique sont les qualités qui vous animent. Vous nous avez initiés aux premiers pas de la recherche.

Nous avons beaucoup bénéficié de vos judicieux conseils durant toute la réalisation de ce travail.

Permettez nous aujourd'hui encore de réitérer notre indéfectible attachement.

A notre Maître et Directeur de thèse

Le Professeur Ogobara K. DOUMBO

MD, Msc, DMT, PHD

Professeur titulaire de Parasitologie et de Mycologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.

Médecin chef du Département D'Épidémiologie des Affections Parasitaires, Directeur du Pôle D'Excellence de Recherche sur le Paludisme, Malaria Research and Training Center (MRTC).

Membre de l'Académie Nationale de Médecine de France.

Cher maître, nous vous disons merci pour la confiance que vous avez placée en nous. A votre école scientifique nous avons appris la rigueur, la patience, la persévérance dans le travail bien fait. Vos qualités de chercheur émérite vous place aujourd'hui dans l'arène internationale. Nous sommes heureux d'être comptés parmi vos élèves.

Soyez rassuré, cher maître, de notre sincère admiration, de notre profonde gratitude et de notre total attachement.

SOMMAIRE

I - introduction.....	n
II - objectifs.....	q
II.1 - Objectif general.....	q
II.2 - Objectifs spécifiques.....	q
III - GéNÉRALITES.....	r
III.1 - Généralités sur les antipaludiques.....	r
.III.1.1 - Définition :	r
Un antipaludique est une substance médicamenteuse qui protège contre le paludisme ou qui le combat.....	r
.III.1.2 - Classification des molécules antipaludiques en fonction de leur mode d'action.....	r
.III.1.3 - Classification des antipaludiques en fonction de leur spectre d'activité.....	S
.III.1.4 - Monographie.....	t
III.1.4.1 - Chloroquine :	u
III.1.4.2 - Amodiaquine :	v
III.1.4.3 - La Sulfadoxine-Pyrimethamine (Fansidar®).....	x
III.1.4.4 - Quinine.....	aa
III.1.4.5 - Artémisinine et ses dérivés.....	dd
III.2 - Généralités sur la résistance de Plasmodium falciparum aux antipaludiques.....	jj
.III.2.1 - Définition de la chimiorésistance :	jj
.III.2.2 - La résistance aux amino-4-quinoléines :.....	kk
III.2.2.1 - La résistance à la chloroquine :.....	kk
.III.2.2.1.1 - Le Pfm ^{dr} 1: Plasmodium falciparum multidrug resistance gene 1.....	kk
.III.2.2.1.2 - Le Pfcrt (Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter) gene :.....	ll
III.2.2.2 - La résistance à l'amodiaquine:.....	nn
.III.2.3 - La résistance aux antimétabolites:.....	nn
.III.2.4 - Quinine, méfloquine et halofantrine (quinoline-méthanol)	oo
.III.2.5 - Dérivés de l'artémisinine	oo
.III.2.6 - Méthode d'évaluation de la chimiorésistance.....	pp
III.2.6.1 - Test in vitro:.....	pp
.III.2.6.1.1 - Tests optiques:.....	pp
.III.2.6.1.2 - Tests isotopiques:.....	qq
.III.2.6.1.3 - Les Nouveaux tests:.....	qq
- a Micro-test de MARKII:.....	qq
- b Test de MAKLER:	qq
- c Tests moléculaires:	qq
Technique de Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR).....	qq
Technique d'hybridation moléculaire.....	rr
Historique.....	rr
III.2.6.2 - Tests “ in vivo” :.....	tt
Test standard de l'OMS de 28 jours:.....	uu
III.3 - Généralités sur la radioactivité.....	uu

.III.3.1 - LA RÉACTION NUCLÉAIRE	vv
.III.3.2 - LES DIFFÉRENTES ÉMISSIONS DE PARTICULES.....	vv
III.3.2.1 - Les particules Alpha.....	vv
III.3.2.2 - Les particules Bêta.....	vv
III.3.2.3 - Les photons gamma.....	ww
III.3.2.4 - Les neutrons	ww
.III.3.3 - LES UNITÉS.....	xx
.III.3.4 - LES SOURCES DE LA RADIOACTIVITÉ.....	yy
.III.3.5 - PROTECTIONS CONTRE LES RAYONNEMENTS	zz
.III.3.6 - ACTIVITE, DECROISSANCE, VIE MOYENNE, PERIODE.....	zz
.III.3.7 - Détecteur de rayonnement	bbb
IV - Methodologie.....	ddd
IV.1 - LIEU D'ETUDE :	ddd
IV.2 - TYPE ET PERIODE D'ÉTUDE	eee
IV.3 - POPULATION D'ETUDE	fff
IV.4 - ECHANTILLONAGE	fff
IV.5 - DONNEES BIOLOGIQUES.....	fff
IV.6 - Considerations ethiques	fff
IV.7 - tECHNIQUES DE LABORATOIRE.....	fff
.IV.7.1 - Technique De La Polymerase Chain Reaction ou Technique d'amplification génique/PCR- RFLP	fff
IV.7.1.1 - Principe.....	ggg
IV.7.1.2 - Extraction de l'ADN.....	ggg
Méthode d'extraction au Nucléon Kit.....	ggg
IV.7.1.3 - Amplification.....	iii
- aPrincipe.....	iii
- bMatériel et réactifs.....	iii
- c Première amplification.....	jjj
- dDeuxième amplification :	kkk
IV.7.1.4 - Digestion :	lll
IV.7.1.5 - Interprétation des résultats.....	mmm
.IV.7.2 - Technique de Dot Blot.....	nnn
IV.7.2.1 - Principe :	nnn
IV.7.2.2 - Modes opératoires	ooo
.IV.7.2.2.1 - Préparation de la membrane pour la technique du Dot Blot	ooo
- aOBJET.....	ooo
- b Principe.....	ooo
- cMatériel et réactifs.....	ppp
- d Mesure de Sécurité et Précautions.....	ppp
- e Technique.....	ppp
- f Utilisations.....	rrr
.IV.7.2.2.2 - Marquage de la sonde par le 32P et purification de la sonde radiomarquée	sss
- aObjet.....	sss
- b Principe.....	sss
- cMatériel et réactifs.....	sss

- d Mesure de Sécurité et Précautions.....	ttt
- e Technique.....	ttt
- f Utilisations.....	vvv
.IV.7.2.2.3 - Hybridation de la sonde radioactive et lavage de la membrane	
.....	vvv
- aObjet.....	vvv
- b Principe.....	www
- cMatériel et réactifs.....	www
- d Mesure de Sécurité et Précautions.....	www
- e Technique.....	www
IV.8 - Calcul du coût.....	aaaa
IV.9 - Temps de realisation.....	bbbb
.IV.9.1 - PCR-RFLP.....	bbbb
.IV.9.2 - Dot blot.....	bbbb
IV.10 - Analyse des données :.....	bbbb
V - résultats.....	bbbb
V.1 - PREVALENCE	cccc
V.2 - Le coÛt	ffff
V.3 - Estimation de la durée de réalisation.....	llll
VI - discussion.....	nnnn
VII - conclusion.....	qqqq
VIII - recommandations.....	rrrr
IX - Abréviations.....	tttt
X-Références:.....	125

Tableaux et Figures

Figure 1 : Structure de la chloroquine.....	u
Figure 2 : Structure de l'amodiaquine.....	w
Figure 3: Mode d'action des sulfamides et des diaminopyridines.....	z
Figure 4 : décroissance de la radioactivité, la vie moyenne et la période du radioélément	bbb
Figure 5 : site d'étude.....	eee
Figure 6 : Gel PCR-RFLP (Source MEDRU/MRTC2007).....	mmm
Figure 7 : étapes du dot blot.....	ooo
Figure 8 : Autoradiographie.....	aaaa
Table I : Unités de mesures de la radioactivité.....	yy
Table II: Exemple de période radioactive.....	aaa
Table III : Les radioisotopes communément utilisés pour le marquage des sondes ADN ou RNA.....	aaa
Table IV: Composition du Master MIX pour la première amplification.....	jjj
Table V: Programme de la première amplification	kkk
Table VI : Composition du Master MIX pour la deuxième amplification.....	kkk
Table VII: Programme de la deuxième amplification.....	lll
Table VIII: Composition du Master MIX de digestion.....	mmm
Table IX: Contrôles pour pfcr.....	qqq
Table X: Mix de dénaturation.....	qqq
Table XI: Séquences des sondes de pfcr 74, 75,76.....	sss
Table XII: Préparation de Mix.....	uuu
Table XIII: Condition d'hybridation et de lavage	yyy
Tableau XIV : Prévalence de la mutation 76T de Pfcrt à Pongonon par PCR-RFLP....	cccc
Table XV: Prévalence de la mutation K76T de Pfcrt à Pongonon par Dot Blot.....	cccc
Table XVI: Comparaison des résultats de PCR-RFLP et de Dot Blot à Pongonon.....	dddd
Table XVII: Prévalence des haplotypes de pfcr (74-76) à Pongonon.....	eeee
Table XVIII: Détection des infections polyclonales.....	fff
Table XIX : Marquage et purification d'une sonde.....	fff
Table XX : Préparation d'une membrane 12x8 cm ²	gggg
Table XXI : Hybridation, le lavage et la révélation d'une membrane de dot blot	hhhh
Table XXII: Le coût de la PCR-RFLP.....	kkkk
Table XXIII : Comparaison de coût du dot Blot à la PCR.....	kkkk

Table XXIV : Temps nécessaire pour PCR 1.....	llll
Table XXV : Temps nécessaire pour PCR 2.....	llll
Table XXVI: Estimation du temps de réalisation de dot blot : cas de pfprt.....	mmmm
Table XXVII: la durée de réalisation de chacune des deux méthodes.....	nnnn

I - INTRODUCTION

De nos jours, le paludisme demeure toujours une endémie mondiale et sévit surtout en Afrique; c'est une maladie fébrile, hémolysante qui constitue un problème majeur de santé publique¹. Il est causé par un hématozoaire du genre *Plasmodium*. Quatre espèces sont inféodées à l'homme: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax*. Chez l'homme *P. falciparum* est le plus redoutable et le plus meurtrier en Afrique². La maladie est transmise par la piqûre infestante d'un anophèle femelle (genre *Anopheles*).

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que le nombre d'individus exposés au risque de contracter le paludisme se situerait entre 2 et 3 milliards, le nombre de cas annuel entre 300 et 500 millions dont 90% en Afrique subsaharienne, le nombre annuel de décès dus à cette maladie oscille entre 1.5 et 2.7 millions³

Un enfant sur 5 en Afrique subsaharienne meurt de paludisme, et ses manifestations cliniques représentent 20-30% des motifs de consultations⁴. Les enfants, avant le développement de leur prémunition contre le paludisme, sont exposés aux risques de développement des formes graves et compliquées de la maladie⁵.

Depuis les années 1960 l'OMS a reconnu l'échec du programme d'éradication du paludisme en zone intertropicale par l'utilisation des insecticides et chimioprophylaxie de masse. Elle a préconisé alors comme objectif principal de la lutte contre le paludisme, la réduction de la mortalité et de la morbidité palustres. La stratégie de lutte est fondée sur trois éléments :

- la prise en charge des cas de paludisme maladie : un traitement précoce représente la meilleure prophylaxie de la létalité palustre.

- la protection personnelle et collective : protection de la femme enceinte par chimioprophylaxie ; lutte anti-vectorielle en utilisant des supports imprégnés d'insecticides rémanents (moustiquaires, écrans, rideaux ...), aspersions intradomiciliaires d'insecticides.
- la prévention et la lutte contre les épidémies^{6, 7, 8}.

Cependant, les efforts et les espoirs qu'ils ont suscités ont été vains à cause du développement et de la diffusion de la résistance des *Anopheles* aux insecticides et du *Plasmodium* aux médicaments^{9, 10}.

La chimiorésistance des parasites constitue un des obstacles majeurs qui entravent les programmes nationaux de lutte contre le paludisme depuis des décennies. La situation mondiale du paludisme est marquée par la résistance des parasites à des antipaludiques majeurs, notamment à la chloroquine, le moins cher des médicaments antipaludiques.

Les premiers cas de résistance à la chloroquine ont été observés en Colombie en 1959 par Young et Moore. Des cas similaires ont été rapportés au Venezuela, au Brésil¹¹. En Thaïlande le premier cas été signalé en 1961¹².

En Afrique elle a été signalée pour la première fois en 1978 précisément en Afrique de l'Est chez un touriste américain^{13, 14}.

Au Mali, les premiers cas furent signalés chez les expatriés français y ayant séjourné en 1987. Plus tard, les premiers cas chez les autochtones ont été décrits en 1989 à Safo¹⁵.

Le phénomène de la chimiorésistance des espèces plasmodiales est un problème ancien, dynamique et qui a évolué dans le temps et dans l'espace. Cette chimiorésistance pose de sérieux problèmes au plan clinique, thérapeutique, prophylactique, social et économique. L'impact de la résistance à la chloroquine de *P. falciparum* sur la mortalité due au paludisme est maintenant bien connu et au cours de la dernière décennie le contrôle des souches résistantes de *P. falciparum* a été identifié comme un objectif prioritaire de santé publique en zone d'endémie. En Afrique, on estime que le doublement en quinze ans des décès imputables au paludisme est une conséquence de la résistance à la chloroquine¹⁶.

Les méthodes d'évaluation *in vivo* sont onéreuses et difficile à réaliser. Le test standard de l'OMS prend un temps assez long. En plus dans les régions hyper endémiques où la transmission est intense, il est difficile de faire la différence entre les réinfections et les recrudescences. Ainsi pour pallier à ces problèmes, les gènes impliqués dans la résistance de *Plasmodium falciparum* à certains antipaludiques ont été identifiés et des méthodes moléculaires de détection des allèles associés à la chimiorésistance ont été établies^{17,18,19} et ont été proposées comme complément aux méthodes *in vivo* pour la surveillance de la chimiorésistance. Parmi les méthodes proposées on peut citer entre autre la PCR, le séquençage, les puces à ADN, les méthodes d'hybridation moléculaire. La PCR présente plusieurs variantes comme la MS-PCR, la PCR à temps réel, la PCR par restriction enzymatique (RFLP).

Actuellement la PCR RFLP est largement utilisée pour la surveillance épidémiologique de la chimiorésistance. Cependant cette méthode est limitée par sa faible capacité de détection des souches minoritaires dans les infections polyclonales²⁰. La méthode de dot blot décrite par Abdel Muhsin qui est une méthode d'hybridation a été proposée pour comme outil de diagnostic moléculaire de la résistance²¹.

Quelle est la valeur ajoutée du dot blot, comme outil moléculaire comparé à la PCR-RFLP pour la surveillance épidémiologique de la chimiorésistance ? Pour apporter des réponses à cette question, nous nous sommes proposé dans ce travail de comparer deux techniques moléculaires de surveillance de chimiorésistance.

II - OBJECTIFS

II.1 - OBJECTIF GENERAL

Evaluer deux techniques moléculaires de détermination de la chimiorésistance.

II.2 - OBJECTIFS SPECIFIQUES

- Déterminer la prévalence du gène *pfcr*t par PCR RFLP et par le dot blot
- Déterminer la spécificité et la sensibilité du dot blot
- Comparer le coût des deux méthodes
- Comparer la durée de réalisation de chacune des deux méthodes
- Déterminer la capacité de détection des infections minoritaires de chacune des deux méthodes
- Déterminer la fréquence des haplotypes de *pfcr*t

III - GÉNÉRALITES

III.1 - GÉNÉRALITÉS SUR LES ANTIPALUDIQUES

.III.1.1 - Définition :

Un antipaludique est une substance médicamenteuse qui protège contre le paludisme ou qui le combat.

.III.1.2 - Classification des molécules antipaludiques en fonction de leur mode d'action

Les principaux antipaludiques actuels peuvent être classés selon leur mode d'action en deux catégories :

❖ Les lysosomotropes

Ils agissent sur la digestion de l'hémoglobine par le parasite. Ce sont :

-les **amino-alcools** : la quinine, la méfloquine, l'halofantrine ; la benfluméthol et la chloroquine

-les **bases de Mannich** : amodiaquine, amopyroquine, pyronaridine,

-**artémisinine** et ses dérivés.

- les **amino-8-quinoléines** : primaquine , tafénoquine

❖ Les antimétabolites ou inhibiteurs des acides nucléiques

Ce groupe comprend les antifolates, les naphthoquinones et les antibiotiques.

✓ **Les antifolates** : ils agissent au niveau de la voie de synthèse des folates, qui sont essentiels à la biosynthèse des acides nucléiques. Ils sont répartis en deux familles :

-les antifoliques : sulfamides dont la sulfadoxine et sulfones. Ils inhibent la dihydroptéroate synthétase (DHPS) qui produit l'acide folique.

-les antifoliques : proguanil, pyriméthamine. Ils inhibent la dihydrofolate réductase (DHFR) qui produit l'acide folinique.

- ✓ **Les naphthoquinones** : l'atovaquone est un inhibiteur puissant des fonctions mitochondriales en bloquant la chaîne de transfert d'électrons au niveau de son enzyme-clé, la dihydroorotate déshydrogénase (DHODase). Elle a peu d'impact thérapeutique quand elle est utilisée seule. En combinaison avec un antimétabolite, (proguanil) on observe une synergie d'action grâce à une inhibition séquentielle de la synthèse des pyrimidines.
- ✓ **Les antibiotiques** : Ils comprennent les tétracyclines (doxycycline), les macrolides (érythromycine, azythromycine, clindamycine). Ils peuvent inhiber la synthèse protéique par inhibition de certaines fonctions de l'apicoplaste. Ils peuvent être utilisés en association dans les zones où prédominent des souches résistantes.

.III.1.3 - Classification des antipaludiques en fonction de leur spectre d'activité.

Les antipaludiques actuellement utilisés agissent de manière sélective à trois niveaux sur les différents stades du développement du parasite. On distingue ainsi :

- ❖ **les schizonticides** : ils sont actifs contre toutes les formes asexués intraérythrocytaires.
 - **les schizonticides d'action rapide**
- ✓ **les sels de quinine** : la quinine, antipaludique majeur extrait du *Quinquina*, est commercialisé sous différentes spécialités. Uniquement utilisée à titre curatif, elle est préconisée pour la gestion de l'accès palustre grave sous forme parentérale
- ✓ **les amino-4-quinoléines** : les plus utilisés et les plus connus de ces produits sont la chloroquine (CQ) et l'amodiaquine (AQ).

Depuis l'extension des phénomènes de résistance, ces molécules ont perdu leur prééminence dans le traitement et la prévention de l'accès palustre.

L'amodiaquine est préconisée dans le traitement de l'accès palustre simple en combinaison avec les dérivés de l'artémisinine

- ✓ **les amino alcools** : molécules de synthèse proche de la quinine ; elles sont actives sur les souches résistantes aux amino- 4-quinoléines. Elles sont déconseillées chez la femme enceinte et allaitante.

La méfloquine : elle a été préconisée à titre curatif uniquement dans les zones multirésistantes.

Son utilisation est actuellement limitée à la prophylaxie chez les voyageurs en provenance des zones non endémiques pour les séjours de courte durée.

L'halofantrine (Halfan®), produit de la famille des phénanthrènes méthanolés est bien tolérée. C'est un schizonticide sanguin actif sur les souches de *P.falciparum* résistants à la CQ.

- ✓ **Les dérivés de l'artémisinine** : artésunate, artéether, artéméther, dihydroartémisine et dérivés

Cette nouvelle classe d'antipaludiques de type peroxyde interfère aussi avec l'utilisation de l'hémoglobine par libération des radicaux libres toxiques pour le parasite.

- **les schizonticides à action lente** : ils sont surtout utilisés dans les associations médicamenteuses. On distingue :

- ✓ les antifoliques : la sulfadoxine est un sulfamide utilisé en association avec un antifolinique (la pyriméthamine) : Fansidar®, Maloxine®.
- ✓ les antifoliniques : le chef de file est le proguanil, molécule utilisée en association avec la CQ dans la prophylaxie du paludisme.

La pyriméthamine : soupçonnée d'embryotoxicité, elle provoque des résistances fréquentes. Elle est associée à d'autres molécules antipaludiques.

- ❖ **Les gamétocytocides** : ils sont actifs contre les gamétocytes sanguins et de manière limitée, contre les stades intrahépatocytaires. Ils empêchent le sang d'être infestant pour l'anophèle. Ils ont une faible valeur curative. Ce sont les amino-8-quinoléines (primaquine).

.III.1.4 - Monographie

III.1.4.1 - Chloroquine :

(diéthylamino-4' methyl-butylamino)-4 chloro-7 quinoleine $C_{18}H_{26}ClN_3$

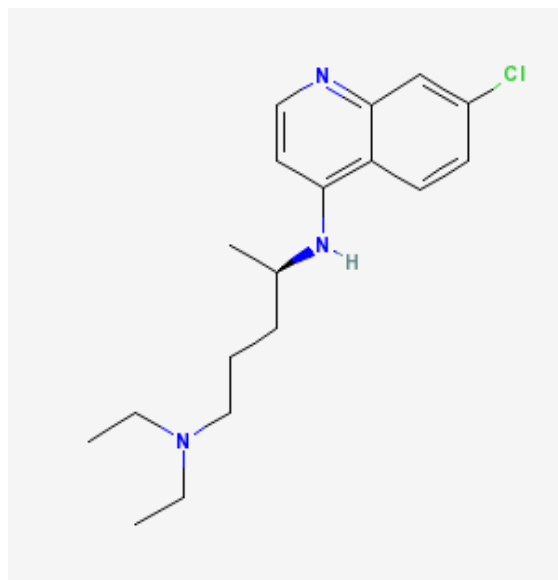


Figure 1 : Structure de la chloroquine.

La chloroquine a été découverte par les chercheurs allemands en 1934 (Resorchin®). Elle a été développée aux Etats-Unis en 1944 sous les appellations Nivaquine®, Aralen®. Elle a été l'antipaludique le plus utilisé depuis cette date. A cause de la résistance, cette molécule n'est plus efficace dans de nombreux pays où les souches de *Plasmodium falciparum* chloroquino-résistantes se sont développées. Les amino-4-quinoléines sont capables d'inhiber la polymérisation de l'hème libéré lors de la digestion de l'hémoglobine par le parasite.

-Activité :

La chloroquine est une base faible lysosomotrope, elle est capable de traverser la membrane de l'érythrocyte parasité et s'accumule dans la vacuole digestive du parasite en suivant le gradient du pH. A l'intérieur de cette vacuole, l'hémoglobine est dégradée par les protéases et fournit une alimentation en acides aminés au parasite, mais aussi produit des groupements d'hème toxiques comme dérivés (hématine). Le parasite normalement détoxifie l'hématine en polymérisant le dérivé en hémazoïne. La chloroquine exerce son activité antipaludique en formant un complexe avec l'hématine

toxique pour le parasite, lequel inhibe sa séquestration en hémozoïne. L'hème libre est lytique pour la cellule.

Formes pharmaceutiques

Poudre blanche, amère, elle est utilisée sous forme de sulfate (Nivaquine® Resorchin® Aralen® Avloclor® Bemaphate® Cidanchin®) ou de diphosphate dans les pays anglo-saxons.

Présentation : comprimé de 100mg et 300mg, sirop à 0.5%.

Pharmacocinétique

Après administration, la résorption est rapide par le tube digestif et quasi complète (80%). Elle atteint son taux plasmatique maximum en 1 à 2 heures. La chloroquine a un taux sanguin élevé et durable par liaison aux protéines plasmatiques avec une proportion de 50%. Le tropisme est hépatique et rénal. 45% est concentré dans les hématies. Elle ne passe pas dans le lait (éventuellement à l'état de traces selon certaines études)²².

La chloroquine est métabolisée par désalkylation et par glucuronoconjugaison. Son élimination est lente et elle se fait par voie rénale. La demi-vie de la chloroquine est dose dépendante, de 3 jours après une prise de 150 mg, 5 jours après 600mg.

Indication :

La chloroquine a été utilisée en chimioprophylaxie avec le proguanil (savarine®) dans les régions où des souches chloroquino-résistantes sont présentes mais minoritaires.

Contre-indications : les principales contre-indications de la chloroquine sont : l'hypersensibilité, le psoriasis, les antécédents d'épilepsie et la porphyrie.

Effets secondaires

Les principaux effets secondaires suites à la prise de la chloroquine sont : le prurit, les nausées ou les vomissements, l'agranulocytose, la porphyrie aiguë intermittente, les douleurs abdominales, la baisse de l'acuité visuelle, le bourdonnement d'oreille, et la diarrhée.

Posologie :

Elle est de 25mg/kg répartis en 3 jours avec 10mg/kg le premier jour, 10mg/kg le deuxième jour et 5mg/kg le troisième jour.

III.1.4.2 - Amodiaquine :

Dichlorhydrate dihydraté de (diéthylaminométhyl-3 hydroxy-4 aniline)-4 chloro-7quinoléine.

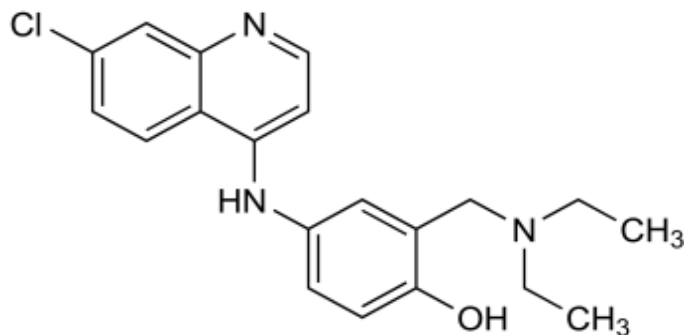
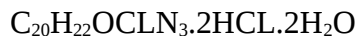


Figure 2 : Structure de l'amodiaquine.

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 chloroquino-résistantes²³.

Elle 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^{24, 25, 26}. Administrée à une grande dose, il a été rapporté qu'elle peut provoquer des effets dont la syncope, la spasticité et des convulsions²⁷. Les études ont montré que l'association amodiaquine et sulfadoxine-pyriméthamine aboutissait à de meilleurs résultats cliniques et parasitologiques que ceux obtenus une fois administrés séparément²⁸. 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 tolérée²⁹. 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.

III.1.4.3 - La Sulfadoxine-Pyriméthamine (Fansidar®)

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 transmission³⁰. 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.

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, suite à 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 prise³¹ 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 autre des anti-convulsivants, du triméthoprim... Aussi chez les enfants il pourrait provoquer l'ictère suite à 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.

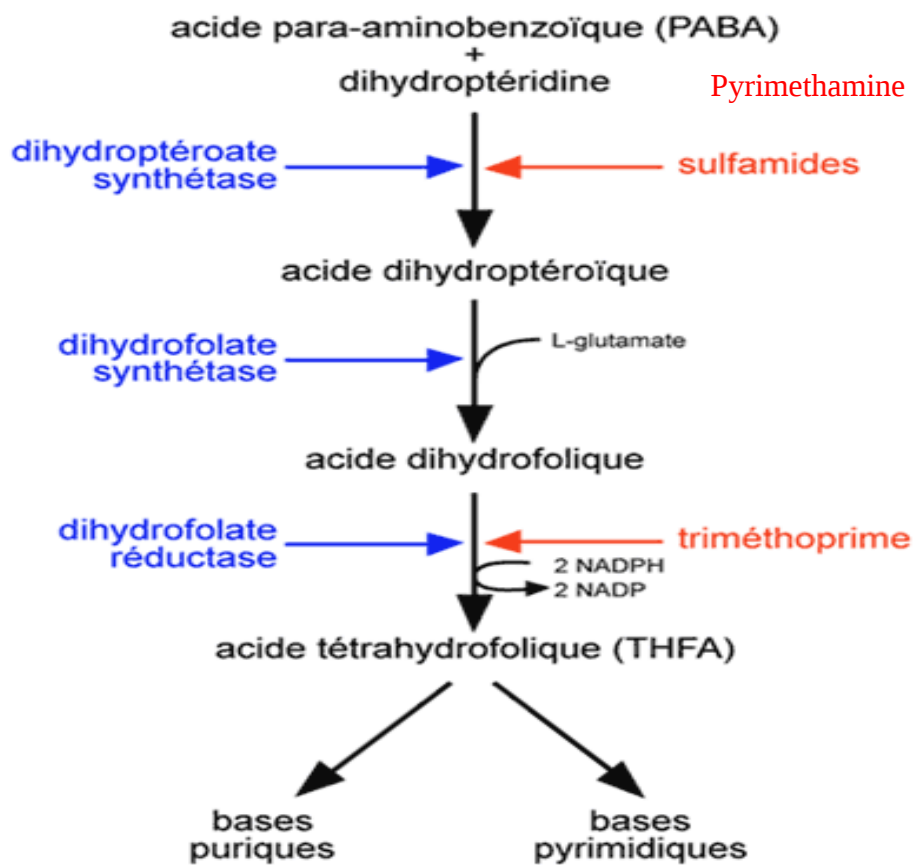
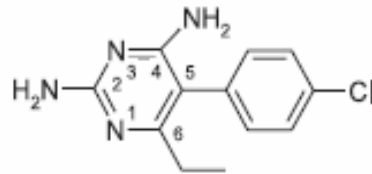


Figure 3: Mode d'action des sulfamides et des diaminopyridines

Source : www.123bio.net/cours/antibio/sulfamides.html.

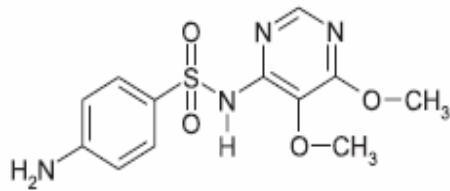
Structure de la pyriméthamine et de la sulfadoxine

Pyriméthamine : Diamino-2-4(chloro-4-phenyl)-5 éthyl-6 pyrimidine
 $C_{12}H_{13}ClN_4$



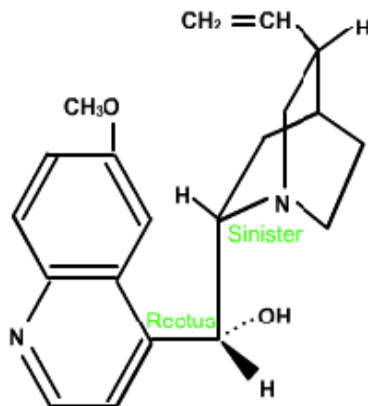
pyrimethamine

Sulfadoxine : L' amino-4 benzène sulfonamide)-6 dimethoxy-4,5
 $C_{12}H_{14}N_4O_4S$



sulfadoxine

III.1.4.4 - Quinine



L'Hydrate de methoxy-6 ethenyl-3 rubanol-9 ou méthyle cupreine

Alcaloïde naturel du quinquina, la quinine est la plus ancienne (découverte depuis le 18^{ème} siècle) et la plus utilisée de ces amino -alcools. Ses propriétés pharmacologiques et en particulier possibilité de l'administrer par voie intra veineuse ou intra rectale en font le médicament de choix lors du traitement du paludisme grave, d'autant plus qu'il existe peu de souches résistantes à ce produit (elles sont surtout présentes en Asie). Elle est donnée à la posologie de 24 mg/kg/j (quinine base) en 3 administrations à 8 heures d'intervalle.

Les effets secondaires :

- Cinchonisme : atteinte cochleo -vestibulaire avec bourdonnements d'oreilles, hypoacousie, vertiges et les tremblements

- Risque d'hypoglycémie lors du traitement par voie parentérale, corrigé par l'administration de la quinine dans du sérum glucose à 10%.

- Voie intramusculaire : possibilité de nécrose et d'abcédation très délabrantes au point d'injection. Risque d'atteinte du nerf sciatique.

Mais les surdosages entraînent rapidement des troubles cardiaques graves : collapsus cardio-vasculaire, trouble de la conduction intra ventriculaire et auriculo-ventriculaire.

La voie intramusculaire doit être évitée si possible compte tenu des risques de nécroses locales et de la paralysie sciatique qui lui sont rattachées ainsi que son manque d'efficacité dans les formes déjà évoluées .Les essais concluants de l'administration par

voie intra rectale de ce produit pallieraient cet inconvénient majeur ³² dans un futur proche.

Action

La quinine est un schizonticide avec une action préférentielle sur les formes jeunes.

Elle agit essentiellement sur les formes érythrocytaires asexuées de toute les espèces de *plasmodium* La quinine se fixe sur l'ADN parasite et inhibe la formation de l'hémozoïne par fixation sur la protoporphyrine IX.

La quinine est rapidement absorbée par la muqueuse gastro- intestinale .La concentration sanguine maximale est obtenue 1 à 2 heures après l'absorption. Elle s'unit aux protéines plasmatiques et traverse la barrière placentaire ; une petite quantité passe dans le liquide céphalo-rachidien. Elle est excrétée rapidement dans les urines sous forme hydroxyde.

L'excrétion commence 15 mn après l'absorption, devient maximale 4 heures après et est complète en 24 heures. Ce facteur nécessite une répétition de la dose journalière.

-La quinine d'action rapide mais également d'élimination rapide. Les doses généralement préconisées sont de 1,50 à 2 g par 24h, soit 25 mg/kg/j. de quinine base répartie en 3 administrations de 8 mg/kg pendant 5 à 7 jours. Elle peut être administrée par voie orale ou par voie parentérale. Les injections intra musculaires doivent être effectuées selon un mode opératoire normalisé et dans les conditions d'asepsie rigoureuse. Elle peut être utilisée en perfusion intraveineuse dans le sérum glucose hypertonique, en administration lente.

- La quinidine est utilisée en perfusion.

Les formulations en suppositoires n'existent plus, car leurs excipients retardent la diffusion alors que le Quinimax en intra rectale a une action rapide. En plus ils sont relativement agressifs pour la muqueuse et ne permettent pas une bonne biodisponibilité de la quinine. C'est ce qui conduit à étudier l'administration de la forme intra rectale

La quinine est hyper insuliniémiante et elle peut déclencher ou aggraver une hypoglycémie en particulier chez la femme enceinte et l'enfant.

Elle n'est ni tératogène, ni abortive à dose thérapeutique et, n'est pas contre indiquée pendant la grossesse. Elle peut accélérer un travail en cours du fait d'une faible activité ocytotique.

La quinine n'est contre indiquée que chez les sujets allergiques et chez les patients ayant un risque de survenue d'une fièvre bilieuse hémoglobinurique.

III.1.4.5 - Artémisinine et ses dérivés

L'artémisinine est dérivée d'une plante : *Artemisia annua*. En Chine, où ils ont été découverts pour la première fois ; les extraits du « *qinghaosu* » étaient reconnus pour leurs propriétés antipyrétiques depuis plus de 1500 ans.

En 1967, un exceptionnel programme coordonné a été mis au point par le gouvernement chinois pour exploiter les propriétés antipaludiques de plusieurs plantes médicinales incluant le « *qinghaosu* ».

En 1971, un dérivé très actif du *qinghao*, connu sous le nom de *qinghaosu* a été obtenu et il est maintenant appelé artémisinine.

Depuis cette découverte initiale, divers dérivés semi-synthétiques liposolubles et hydrosolubles de l'artémisinine ont été développés avec une variété de formulations.

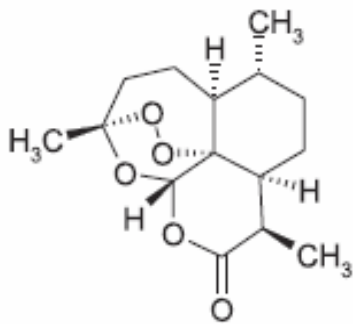
Ces composés sont efficaces contre le paludisme à *P. falciparum* polychimiorésistant. Ils ont une action thérapeutique plus rapide sur la charge parasitaire et la résolution des symptômes que les autres antipaludiques. Leur demi-vie très courte et leur activité gamétocytocide réduisent la probabilité de développement des résistances vis-à-vis de ces molécules.

Utilisés seuls, les dérivés de l'artémisinine guérissent le paludisme à *P. falciparum* en sept jours, mais plusieurs études ont montré que, combinés à certains médicaments de synthèse, ils donnent des taux de guérison satisfaisants en seulement trois jours avec une meilleure compliance au traitement ³³.

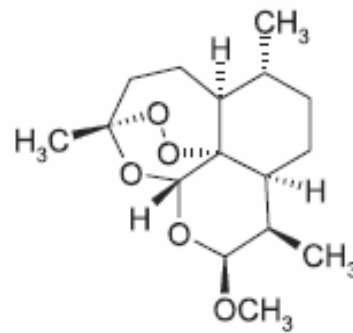
Ces composés ont des propriétés parasitologiques remarquables *in vivo* en arrêtant rapidement le métabolisme parasitaire.

Chimie de l'artémisinine et de ses dérivés

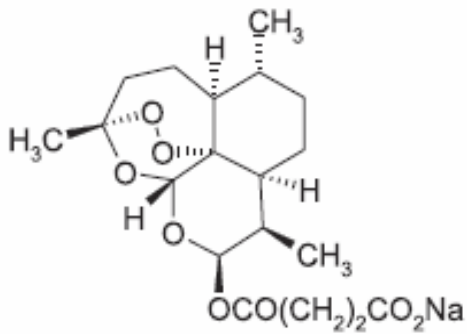
Structures



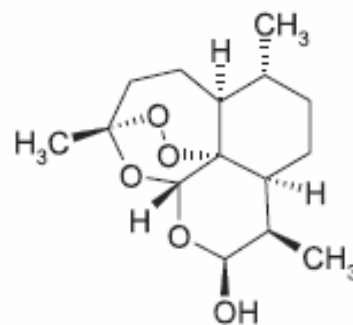
artemisinin



artemeter



sodium artesunate



dihydroartemisinin

C'est un sesquiterpène lactone à radical peroxyde.

C'est un composé très cristallin non soluble dans l'huile ou l'eau.

Il ne comporte pas d'hétérocycle azoté, ce qui le différencie de la majorité des autres antipaludiques

Il est facilement purifié par cristallisation après extraction d'*Artemisia annua*.

C'est aussi un composé mère pour les dérivés sémi-synthétiques qui ont été chimiquement modifiés en position C10 pour produire l'artésunate, l'artéméther, l'artéether, la dihydroartémisinine et l'acide artélinique.

Indications thérapeutiques

Antipaludique :

- des formes sévères
- des formes non compliquées, dans ce cas il faut toujours les administrer en combinaison avec un autre schizonticide sanguin efficace afin d'éviter toute recrudescence et de retarder la sélection de souches résistantes.

Propriétés antipaludiques

Les artémisinines détruisent toutes les espèces de plasmodiums infectants les humains, les stades asexués de l'infection sont les plus sensibles. En commun avec les autres antipaludiques, les artémisinines sont particulièrement actifs quand les parasites commencent à devenir plus actifs sur le plan métabolique.

Ils inhibent aussi le métabolisme des parasites plus rapidement que les autres antipaludiques.

Ils réduisent aussi la cytoadhérence des globules rouges infectés, un déterminant reconnu de la virulence.

Ils n'interfèrent pas avec le stade hépatique du développement du parasite et donc n'ont pas d'effet prophylactique.

Propriétés pharmacodynamiques

Contrairement aux autres antipaludiques utilisés, les artémisinines sont actifs sur tous les stades de développement intraérythrocytaire et visent également les formes très jeunes qui sont uniquement présentes quelques heures après que les globules rouges soient envahis par le stade mérozoïte.

Mécanisme d'action

Depuis plusieurs décennies, l'action antipaludique des artémisinines a été attribuée à leur capacité à générer des radicaux libres et à la présence du groupement peroxyde :

- L'artésunate, l'artéméther et leur métabolite, la dihydroartémisinine (DHA) exercent leur effet après leur pénétration dans les érythrocytes infectés, la lipophilie des molécules joue un rôle important dans le respect de ce principe, mais le mécanisme détaillé de l'absorption demeure inconnu.
- Une fois à l'intérieur du parasite, et probablement catalysé par la présence des ions Fe^{2+} et de l'hème, le pont peroxyde est ouvert. Un puissant processus oxydatif en résulte quand un corps oxygéné est libéré.

Ce processus met en danger la survie des parasites. En surveillant l'état des parasites toutes les heures à l'aide du microscope électronique, il a été observé pendant la première heure après l'administration que toutes les membranes du parasite sont progressivement affectées et désintégrées : la vacuole centrale en premier puis la membrane mitochondriale et la membrane nucléaire. A ce moment la survie du parasite n'est plus possible.³⁴

A part cette action oxydative, une fois le pont peroxyde ouvert, la molécule se conduit aussi comme un radical libre. Les radicaux libres sont capable de « liaisons covalentes » avec les protéines du parasite et de majorer l'action cytotoxique. C'est probablement l'effet combiné des deux mécanismes qui contribue à la destruction rapide des parasites. Peu de parasites semblent être capables de survivre à cette attaque peroxyde de la dose de charge et ils reprennent les cycles quand ils ne sont pas tués.

Des études *in vitro* résument le mécanisme d'action de cette drogue qui se ferait par l'effet direct sur le métabolisme de *P.falciparum* de la façon suivante :

- diminution de la synthèse protéique ;
- diminution du métabolisme des acides nucléiques ;

- diminution du métabolisme des polyamines ;

D'autres études démontrent une réaction avec l'hémine pour former un pont par l'intermédiaire de son radical peroxyde. Les membranes parasitaires étant riches en hémine ceci expliquerait la toxicité sélective de cette drogue sur les parasites.

Métabolisme et pharmacocinétique

Métabolisme

Une fois absorbés, les dérivés de l'artémisinine sont convertis premièrement en dihydroartémisinine et en métabolites inactifs par le cytochrome hépatique P-450 et d'autres systèmes enzymatiques. L'importance de la conversion en dihydroartémisinine diffère entre les dérivés.

Les études des formulations orales montrent une absorption rapide et sûre dans le traitement du paludisme non compliqué.

Un autre cas de métabolisme se produit par la formation de dérivés oxygénés où un atome d'oxygène du pont peroxyde disparaît. Ce composé oxygéné n'est pas actif comme antipaludique. Les autres métabolites formés résultent des hydroxylations et des conjugaisons avec l'acide glucuronique par exemple.

Liaison aux protéines

La DHA est surtout liée aux protéines plasmatiques et la liaison se fait principalement aux alpha-1-acide, aux glycoprotéines, à l'albumine aussi et aux globules rouges.

Pour l'artéméther la liaison aux protéines plasmatiques est voisine de 77%, dans le cas de l'artésunate on assiste plutôt à une accumulation dans les érythrocytes infectés.

Elimination

Les artémisinines sont éliminés rapidement. Les médicaments et leur métabolite sont complètement excrétés dans les heures qui suivent la prise.

La DHA a une demi-vie d'élimination d'environ 45 minutes, celle de l'artésunate est d'une heure et pour l'artéméther la demi-vie d'élimination est de 2 heures pour la forme orale et de 4 à 11 heures pour la forme intraveineuse.

III.2 - GÉNÉRALITÉS SUR LA RÉSISTANCE DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* AUX ANTIPALUDIQUES

.III.2.1 - 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 sujet³⁵.

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. Comme chez les bactéries, les principaux mécanismes de la résistance pourraient être dus :

- Soit à l'inactivation enzymatique ou à la dégradation des médicaments³⁶.
- Soit à une altération du site de fixation du médicament.
- Soit à une inhibition de l'entrée du médicament³⁷.
- Soit à un reflux actif du médicament au niveau de son site d'action.

Les variants issus d'erreurs de répllication de l'ADN, sont d'autant plus fréquents que la multiplication asexuée est rapide et que les systèmes enzymatiques de réparation de l'ADN sont imparfaits. Il y a sélection de plasmodies mutantes lorsque la concentration de l'antipaludique est suffisante pour inhiber la multiplication des plasmodies sensibles mais insuffisante pour bloquer celle des mutants, phénomène désigné sous le nom de « sélection médicamenteuse »³⁸. On pense que ce processus sélectif est facilité par la présence de concentrations plasmatiques infra thérapeutiques d'antipaludiques et lorsque la courbe dose-réponse est plate.

Un parasite résistant est celui qui présente une ou plusieurs mutation(s) génétique(s) au niveau de son ADN (selon les médicaments).

Les mutations génétiques ne sont pas dues à l'action du médicament, mais sont des anomalies qui se produisent lors de la réplication de l'ADN chromosomique ou mitochondrial du parasite. Donc le médicament administré à un sujet porteur de parasites trouve déjà présents dans l'organisme de celui-ci des parasites, soit préalablement mutés (résistants) soit non mutés (sensibles)³⁹.

.III.2.2 - La résistance aux amino-4-quinoléines :

III.2.2.1 - La résistance à la chloroquine :

C'est la molécule de synthèse la plus largement distribuée et elle représente sûrement l'un des produits ayant été le plus utilisé au monde au cours de ces cinquante dernières années. La large diffusion des résistances de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine est devenue un facteur limitant son emploi. Actuellement deux gènes seraient impliqués dans le phénomène de la chloroquino-résistance: le *Pfmdr1*⁴⁰ et le *Pfcr*⁴¹. *Reference source not found.*

.III.2.2.1.1 - Le *Pfmdr1*: *Plasmodium falciparum* multidrug resistance gene 1

Des homologues du gène *mdr*, responsables de la multirésistance des cellules cancéreuses aux médicaments anticancéreux ont été découverts chez *P. falciparum* et nommés *Pfmdr1* et *Pfmdr2*.

Le *Pfmdr2* est localisé sur le chromosome 14 de *P. falciparum*. Les études ont montré qu'il n'était pas impliqué dans la résistance à la chloroquine. Ce gène ne présente pratiquement aucune variation entre les parasites sensibles et ceux résistants⁴¹.

En revanche des variations dans le nombre de copies du gène *Pfmdr1*, le gène correspondant situé sur le chromosome 5 du parasite, associées ou non avec des mutations ponctuelles, ont été initialement considérées dans la chloroquino-résistance. Des mutations ponctuelles de *Pfmdr1* sont liées à la chloroquino-résistance dans certaines études de terrain, par contre certains auteurs ont trouvé le contraire⁴².

Le gène *Pfmdr1* code pour une protéine de perméabilité d'un poids moléculaire de 170kD. Comme les homologues des cellules cancéreuses, cette protéine serait impliquée dans le transport trans-membranaire de la chloroquine et d'autres molécules⁴³. Une

mutation au niveau du *Pfmdr1* Asn-Tyr en position 86 pourrait contribuer à la chloroquino-résistance⁴⁴.

.III.2.2.1.2 - Le *Pfcr* (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter) gene :

L'équipe de Wellems a montré qu'une mutation de ce gène codant pour une protéine trans-membranaire (*Pfcr*) de la vacuole digestive de *Plasmodium falciparum* est responsable de la résistance à la chloroquine. Le gène *pfcr* est entièrement séquencé et comprend 13 exons.. Cette première étude a montré que les souches résistantes d'Asie et d'Afrique ont un des variants "*Pfcr*" qui diffère du gène sensible à la chloroquine par 7 ou 8 mutations ponctuelles. En Amérique du sud, cette résistance est associée à d'autres variants "*Pfcr*" porteurs de plusieurs mutations. Toutefois, les variants "*Pfcr*" de ces trois régions ont en commun, deux mutations spécifiques (K76T et A220S). Les auteurs ont trouvé que la mutation d'un unique gène situé sur le chromosome 7 de *Plasmodium falciparum* conférait la résistance à la chloroquine. Ils ont également pu convertir une souche sensible à la chloroquine en une souche résistante en lui introduisant le gène muté "*Pfcr*". Une étude réalisée sur terrain et adoptant le protocole de l'OMS 1996 a montré que tous les patients porteurs d'une infection palustre après traitement à la chloroquine présentaient la forme mutée de ce gène⁴⁵. Toutefois on ne connaît pas encore le rôle précis et la fonction jouée par la protéine codée par ce gène, ni le mécanisme par lequel cette protéine confère la résistance à la chloroquine.

Différents haplotypes de *pfcr* IEK, IET, MEK, MET, INK, INT, MNK, MNT (positions 74, 75, 76) ont été décrits. Les parasites chloroquino-sensibles présentent un haplotype CVMNK (positions 72-76) considéré comme l'allèle sauvage. Les allèles résistants sont CVIET pour l'Afrique et l'Asie et SVMNT pour l'Amérique du Sud et la Papouasie-Nouvelle Guinée.

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer le mécanisme de la chloroquinorésistance. 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 et al, la résistance à la CQ repose sur une stimulation de l'échange Na^+/H^+ . Ils ont pu démontrer que la CQ stimule mieux l'échange Na^+/H^+ chez les parasites sensibles ce qui accroît de ce fait le transport du médicament. Or, 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 : (i) 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 le mutant Pfcrt ; (ii) une expulsion directe de la chloroquine à partir de la vacuole digestive via le mutant Pfcrt, résultant d'une augmentation d'affinité pour ce transporteur de la chloroquine. Le rôle de pompage attribué au Pfcrt 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 Pfcrt, au moins dans le système de remplacement allélique récemment développé pour les analyses fonctionnelles fines du gène *Pfcrt* ⁴⁶.

Les événements génétiques qui confèrent la résistance aux antipaludiques (en gardant la viabilité des parasites) sont spontanés et rares et sont connus pour être indépendants du médicament utilisé. Une seule mutation génétique peut suffire ou de multiples événements non liés peuvent être nécessaires (épistasie). *P. falciparum* en Asie du sud a démontré une très grande capacité de développer la résistance aux antipaludiques⁴⁷. La chloroquinorésistance de *P. falciparum* pourrait être multigénique et est initialement conférée par les mutations dans le gène *Pfcrt*. En présence des mutations Pfcrt, les mutations

dans un second transporteur (*Pfmdr1*) module le degré de résistance *in-vitro*, mais le rôle du *Pfmdr1* dans la survenue de la chloroquinorésistance après un traitement à base de chloroquine reste non élucidé⁴⁸. Au moins un autre gène non encore identifié est supposé être impliqué⁴⁹. La résistance à la chloroquine de *P. falciparum* est survenue spontanément moins de dix fois dans les cinquante dernières années⁵⁰. Ceci suggère que la probabilité que le parasite lui-même développe la résistance de novo est sous l'ordre de 1 sur 10²⁰ multiplications du parasite⁵¹.

III.2.2.2 - 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 chloroquino- résistance est élevée^{52, 53, 54}. Cependant dans certaines zones l'amodiaquine utilisée en monothérapie s'avère moins efficace⁵⁵. Une résistance croisée partielle avec la chloroquine a été également décrite⁵⁶.

Jusqu'à nos jours il n'y a pas de marqueur moléculaire pour l'amodiaquine. On pense que des variations alléliques sur le *Pfcr1* et sur le *Pfmdr1* auraient une relation avec une élévation de résistance à l'amodiaquine⁵⁷.

.III.2.3 - La résistance aux antimétabolites:

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 sulfadoxine⁵⁸.

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 sulfadoxine⁵⁹. 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*^{60, 61, 62}. 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*⁶³. Cependant certains auteurs ont trouvé une relation entre les échecs thérapeutiques et le génotype quintuple mutant⁶⁴.

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^{65, 66}.

.III.2.4 - Quinine, méfloquine et halofantrine (quinoline-méthanols)

Leurs mécanismes d'action diffèrent de ceux des amino-4-quinoléines (CQ, AQ), dans la mesure où leur capacité d'interférer avec la détoxification de l'hématine est mineure. Les travaux les plus récents indiquent que la protéine Pgh-1 est susceptible d'être une cible des quinoline-méthanols.

Un phénomène d'efflux a donc été proposé pour expliquer la résistance aux quinoline-méthanols. Les études *in vitro* ont montré que le phénotype R pour la méfloquine est associé à une amplification d'expression du gène *Pfmdr-1* (*P. falciparum* multidrogue resistance) et à la surexpression de *Pgh-1*⁶⁷.

Cette protéine localisée dans la membrane de la vacuole digestive, pourrait être impliquée dans l'efflux des quinoline-méthanols, mais ceci n'est pas encore bien établi. Il se pourrait aussi que, *Pgh-1* étant impliqué dans la détoxification de l'hématine, la surexpression de *Pgh-1* permette au parasite de détoxifier l'hématine en présence de méfloquine. Les souches rendues résistantes *in vitro* à la méfloquine acquièrent un certain degré de résistance à la quinine et à l'halofantrine, ce qui suggère un mécanisme principal commun à l'acquisition de résistances vis-à-vis de ces molécules. Des souches résistantes à la méfloquine et pour lesquels aucune anomalie dans la séquence ou

l'expression de *Pfmdr-1* n'a été identifiée ont été signalées, ce qui montre que d'autres mécanismes d'échappement à l'action de la méfloquine existent.

.III.2.5 - Dérivés de l'artémisinine

Il n'a pas été signalé de résistance clinique à l'artémisinine ou à ses dérivés. On a montré que la sensibilité des isolats cliniques et des souches de laboratoire variait par rapport à ces médicaments, mais rien ne prouve que ce soit lié à des échecs thérapeutiques^{68, 69}. Il a néanmoins été développé en laboratoire des souches de *P. falciparum*⁷⁰ et de *P. yoelli*⁷¹ résistantes à l'artémisinine malgré l'instabilité de ce trait.

Le phénotype R chez *P. yoelli* est associé à un déficit d'accumulation d'environ 50% par rapport au phénotype S. Assez récemment, il a été démontré que les dérivés de l'artémisinine agissent par inhibition du SERCA (Sarcoplasmic/ Endoplasmic Reticulum Ca (2+) ATPase), une pompe calcique impliquée dans la régulation du taux de calcium intraplasmodial et située hors de la vacuole digestive⁷².

.III.2.6 - Méthode d'évaluation de la chimiorésistance

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

III.2.6.1 - Test *in vitro*:

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

.III.2.6.1.1 - Tests optiques:

Le micro-test OMS et le semi-micro-test de Le Bras^{73, 74} ont été mis au point à la fin des années 70 afin d'évaluer la sensibilité de *P.falciparum* à certains médicaments. Ils sont basés sur la capacité des doses croissantes d'antipaludiques testés à empêcher la maturation des trophozoïtes de *Plasmodium falciparum* en schizontes, lorsque le

prélèvement sanguin est mis en culture dans du milieu RPMI (Roosevelt Park Memorial Institute) et incubé à 37°C, en présence du CO₂ et de l'O₂, pendant 24 à 48 heures. Les résultats s'expriment en concentration minimale inhibitrice (CMI), pour le micro-test OMS, et en concentration inhibitrice 50% (CI₅₀) OU 90% (CI₉₀) pour le semi-micro-test.

.III.2.6.1.2 - Tests isotopiques:

Il s'agit du micro-test isotopique de Desjardins et le semi-micro-test isotopique de Le Bras et Deloron^{75, 76}.

Ce sont des modifications, respectivement, du micro-test OMS et du semi-micro-test optique par l'adjonction dans chaque cupule d'un radio-isotope, l'hypoxanthine tritiée. La maturation des parasites est révélée par l'incorporation du radio-isotope dans le noyau des parasites. La mesure de la radioactivité se fait après 42 à 48 heures d'incubation, à l'aide d'un compteur à scintillation. Les résultats sont donnés en coups par minute (CPM) et l'activité du médicament est exprimée en CI₅₀ ou en CI₉₀.

.III.2.6.1.3 - Les Nouveaux tests:

Les tests récemment mis au point sont :

Le micro-test de MARKII

Le test de MAKLER

Les tests moléculaires

- a Micro-test de MARKII:

C'est une modification du 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.

- b Test de MAKLER⁷⁷:

C'est un test enzymatique fondé sur la capacité du lactate déshydrogénase (LDH) de *P. falciparum* à utiliser rapidement la 3-acétylpyridine adénine dinucléotide dans la réaction

aboutissant à la formation du pyruvate à partir de la L-lactate. Le test vise à détecter et à quantifier la pLDH par une technique enzymatique, en présence de l'antipaludique étudié. Il existe une corrélation entre la densité parasitaire et l'activité de la pLDH.

- c Tests moléculaires:

- **Technique de Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)**

- ✓ **Principe :**

Cette technique permet d'évaluer le niveau de mutation 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 à 2%.

- ✓ **Technique :**

Cette technique décrite en 1986 par K. Mullis et al⁷⁸ 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, il faut synthétiser deux oligonucléotides qui vont servir d'amorces à la Taq polymérase.

Des cycles successifs sont entrepris, chaque cycle comprenant :

- Dissociation par la chaleur pour séparer les deux brins de l'ADN.
- Association avec les deux amorces spécifiques. La fixation 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 DNA polymérase.

Cette technique a eu de l'ampleur avec la découverte en 1988 d'une ADN polymérase non inactivée par la chaleur. Il s'agit de la Taq polymérase (isolée d'une bactérie thermophile adaptée à la vie dans des sources d'eau chaude ("*Thermus aquaticus*"). Avec la Taq polymérase on peut effectuer un nouveau cycle (dissociation, Association des amorces, réplication de l'ADN) sans avoir à ajouter chaque fois de l'enzyme. Il est maintenant possible d'automatiser ces réactions grâce à des thermocycleurs programmables en température et en temps.

- **Technique d'hybridation moléculaire**

✓ **Historique**

La technique du buvardage de Southern ou Southern Blot en anglais est une méthode de biologie moléculaire. La méthode a été baptisée du nom de son inventeur, le biologiste britannique Edwin Southern, et ceci a permis d'élaborer d'autres méthodes de buvardage (par exemple, le buvardage de western ou western blot en anglais, le buvardage northern ou northern blot en anglais, le buvardage en point ou Dot Blot).

✓ **Principe**

Nous partons des fragments d'ADN obtenus par les enzymes de restriction. Nous allons appliquer la technique du buvardage de Southern pour fixer les sondes (une sonde est un fragment d'ADN auquel on a marqué une base grâce à des composés radioactifs ou fluorescents. Une sonde sert à localiser une séquence de l'ADN qui nous intéresse). Cela va permettre de repérer les fragments d'ADN voulus. Le buvardage de Southern sert donc à repérer des fragments d'ADN. D'une façon plus générale, ces fragments obtenus vont présenter des polymorphismes de restriction. Un polymorphisme de restriction est une variation individuelle de la séquence des bases du génome des eucaryotes modifiant un ou plusieurs sites de restrictions.

Donc, ces polymorphismes de restriction (mutations), vont, dans les faits, être intéressants pour déterminer des variations géniques, des tests de paternité par exemple.

✓ **Méthode**

Le gel d'électrophorèse est trempé dans une solution alcaline (contenant habituellement de l'hydroxyde de sodium) afin de permettre la dénaturation de l'ADN bicaténaire.

Une feuille de membrane en nitrocellulose (ou encore en nylon) est placée sur le gel. Une pression est appliquée au gel en plaçant une pile de serviettes de papier et par un poids sur la membrane et le gel, par exemple. Ceci va permettre le déplacement de l'ADN contenu dans le gel sur la membrane, où il va se fixer.

La membrane est alors chauffée, dans le cas de nitrocellulose, ou exposée au rayonnement ultraviolet si c'est du nylon, et ce, afin de fixer de manière permanente l'ADN sur la membrane.

La membrane est ensuite mise en contact avec une sonde spécifique de la séquence d'ADN recherchée. La sonde est marquée de sorte qu'elle puisse être détectée, habituellement par incorporation de la radioactivité ou en "étiquetage" de la molécule avec un fluorophore. Dans certains cas, la sonde peut être faite à partir d'ARN, plutôt que d'ADN.

Après hybridation, la sonde en excès est éliminée de la membrane par différents lavages, et l'hybridation est visualisée sur un film autoradiographique, dans le cas d'une sonde radioactive ou fluorescente.

✓ **Résultat**

La sonde va révéler la position sur la membrane des fragments d'ADN recherchés. Plusieurs situations peuvent se présenter:

-Les fragments d'ADN sont semblables au lieu d'hybridation de la sonde et à proximité de celui-ci, et les fragments sont de même taille: il n'y a pas de polymorphisme.

-Un site de restriction au voisinage de la sonde n'est présent que chez l'un des deux individus; le fragment n'ont pas la même taille et ne sont donc pas à la même hauteur sur le gel: il y a polymorphisme de site de restriction.

-Les sites de restriction sont identiques, mais une séquence supplémentaire est présente chez l'un des deux fragments. Les vitesses de migration des fragments et donc leur position sur le gel sont donc, ci aussi, différentes: il y a polymorphisme d'insertion/délétion.

✓ **Dot bot**

Le buvardage en point est une technique comparable au buvardage de Southern mais sans séparation par électrophorèse.

L'appellation anglaise tire son nom du vocable « dot » signifiant point.

En effet les dépôts d'échantillons se font en point dans cette technique. Elle consiste à détecter spécifiquement des fragments d'ADN transférés sur filtre par leur hybridation à des séquences complémentaires marquées par un radioisotope.

III.2.6.2 - Tests “ *in vivo*”:

Elle consiste à administrer, à un sujet porteur de *Plasmodium falciparum*, la dose ordinairement recommandée de l’antipaludique à tester, et à contrôler la disparition des parasites du sang au bout d’un temps donné. L’évaluation de l’efficacité des schémas thérapeutiques se fait directement avec ces tests. Les tests *in vivo* habituels comportent: le test prolongé de 28 jours.

Actuellement l’OMS propose des suivis de 28, 28, 42, 42 et 63 jours respectivement pour la chloroquine, l’amodiaquine, la sulfadoxine-pyriméthamine, la luméfantine-artémether (Coartem®) et la méfloquine⁷⁹.

Test standard de l’OMS de 28 jours⁸⁰:

Il consiste à traiter les patients présentant une infection mono spécifique à *Plasmodium falciparum* avec contrôle de la parasitémie aux jours 1, 2, 3, 7, 14, 21 et 28.

Ce test présente les avantages suivants :

- Adhésion facile de la population car elle y trouve un intérêt médical immédiat.
- Détermination du niveau de la résistance afin d’adopter un schéma thérapeutique adéquat.
- Matériel utilisable simple.
- Ils peuvent fournir des éléments de pharmacovigilance de l’antipaludique utilisé.

Cependant le test de 28 jours peut avoir des inconvénients :

- Faux résultats liés aux troubles du métabolisme du médicament, au niveau immunitaire du malade, et aux troubles d’absorption du médicament.
- Durée longue pour le diagnostic de la résistance.
- Difficultés de mettre les sujets hors d’état de réinfections en zone d’endémie surtout pendant la saison de transmission (épreuve de 28 jours).
- Critères d’inclusion souvent difficiles à mettre en pratique entre autre l’absence de la prise antérieure d’antipaludiques.
- Temps de réalisation assez long

-Insuffisance liée à la technique microscopique, en particulier la sensibilité, la spécificité, qui sont fonction de la compétence du lecteur.

III.3 - GÉNÉRALITÉS SUR LA RADIOACTIVITÉ

III.3.1 - LA RÉACTION NUCLÉAIRE

On appelle réaction nucléaire le processus entraînant une modification du noyau des atomes.

Les atomes qui constituent la matière sont en général stables, mais certains d'entre eux se transforment spontanément en émettant des rayonnements qui emportent de l'énergie. C'est ce qu'on appelle la radioactivité.

Les noyaux stables, existant dans la nature, peuvent être transformés en noyaux instables, donc radioactifs, par une réaction nucléaire provoquée (ou artificielle).

Cette réaction nucléaire consiste à bombarder des éléments naturels par des particules provenant d'un réacteur ou émises par des sources radioactives.

Le principe de la radioactivité se résume donc à une ionisation qui peut être soit directe pour les électrons et les particules, soit indirecte pour les photons et les neutrons.

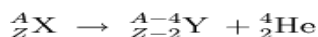
Une propriété importante de l'émission radioactive, c'est qu'elle ne peut être arrêtée, ou accélérée, par aucun procédé physique ou chimique.

III.3.2 - LES DIFFÉRENTES ÉMISSIONS DE PARTICULES

On distingue 3 types de rayonnements correspondant à 3 formes de radioactivité :

III.3.2.1 - Les particules Alpha

On parle de radioactivité alpha (α) pour désigner l'émission d'un noyau d'hélium ou hélion :



La radioactivité alpha se traduit par l'émission d'un noyau d'hélium (rayons alpha), édifice particulièrement stable constitué de 2 protons et de 2 neutrons, appelé particule.

De pénétration faible, les particules alpha sont émises à une vitesse avoisinant les 20 km/s. Cependant étant lourdes et chargées électriquement, elles sont arrêtées très

facilement et rapidement par les champs électromagnétiques et les atomes composant la matière environnante. Une simple feuille de papier suffit à arrêter ces particules.

III.3.2.2 - Les particules Bêta

La radioactivité bêta correspond à la transformation, dans le noyau soit d'un neutron en proton, radioactivité bêta-, caractérisée par l'émission d'un électron e^- ; soit d'un proton en neutron, radioactivité bêta+, caractérisée par l'émission d'un anti-électron ou positron e^+ ; elle ne se manifeste que dans des noyaux radioactifs produits artificiellement par des réactions nucléaires.

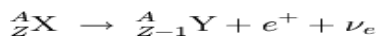
- **Bêta moins** : Pénétration moyenne. L'électron émis ayant une masse infime, selon la théorie de la relativité, il a une vitesse proche de celle de la lumière (environ 290 000 km/s). Cependant, chargé électriquement, il va être arrêté par la matière et les champs électromagnétiques environnants. Une feuille d'aluminium de quelques millimètres peut arrêter les électrons. Un écran d'un centimètre de plexiglas arrête toutes les particules bêta moins inférieures à 2 MeV.

Equation :



- **Bêta plus** : La pénétration est semblable à celle des électrons. Mais à la fin de son parcours, un positron s'annihile avec un électron rencontré sur son passage en formant deux photons gamma, ce qui ramène le problème au cas du rayonnement gamma.

Equation :



III.3.2.3 - Les photons gamma

La radioactivité gamma à la différence des deux précédentes, n'est pas liée à une transmutation du noyau. Elle se produit par l'émission d'un rayonnement électromagnétique, comme la lumière visible ou les rayons X mais plus énergétique. Cette radioactivité peut se manifester seule ou en accompagnant la radioactivité alpha ou bêta. Pénétration très grande, fonction de l'énergie du rayonnement : plusieurs centaines de mètres dans l'air. Une forte épaisseur de **béton** ou de **plomb** permet de s'en protéger.

III.3.2.4 - Les neutrons

Ces particules neutres, possèdent une masse et n'ont pas d'action électromagnétique. Elles n'agissent sur les noyaux que par interaction forte. Le pouvoir de pénétration de ces rayonnements est très puissant et très agressif pour le corps humain.

Ainsi, lors d'une explosion nucléaire, la propagation de ces particules couvre de un à plusieurs km.

L'exposition de l'organisme à ces rayonnements peut entraîner les conséquences suivantes :

- rayonnement alpha : risque de contamination externe sans irradiation. Risque éventuel de contamination et d'irradiation internes.
- rayonnement bêta : faible risque d'irradiation externe. Risques de contamination externe, de contamination et d'irradiation internes.
- rayonnement gamma : risques de contamination et d'irradiation externe et interne. Les activités employées étant en général faibles, le risque d'exposition externe l'est également à l'exception de la manipulation d'activités importantes, d'émetteurs gamma ou bêta, d'énergie élevée.

.III.3.3 - LES UNITÉS

Dans le domaine de la radioactivité, il existe trois mesures différentes qui répondent chacune à un aspect bien précis de la radioactivité.

Ainsi, l'unité de mesure de la radioactivité est **le becquerel**. Il correspond à une désintégration ou une transformation d'un atome par seconde.

On utilise également le curie. (1curie = 37 milliards de becquerel) qui correspond au nombre de noyaux qui se désintègrent dans un gramme de radium par seconde. Il correspond à l'ancien système (voir dans le tableau1 et sur le schéma un peu plus bas). La mesure de la quantité d'irradiation reçue ou dose absorbée par une personne s'exprime en **gray** ou en **rad**. (1gray = 100rads)

A dose équivalente, l'effet produit par les divers rayonnements sur une personne varie selon leur nature et celle des organes exposés. Il se mesure en **sievert** ou en **rem**. (1sievert = 100rems). C'est l'équivalent de dose efficace.

Table I : Unités de mesures de la radioactivité

Grandeurs	Unités	Équivalences	Définitions
Activité	Becquerel (Bq)	1 Bq = 27 pCi	Grandeur représentant le nombre de désintégration par seconde au sein d'une matière radioactive
	Curie (Ci)	1 Ci = 3,7.10 ¹⁰ Bq	
Dose absorbée	Gray (Gy)	1 Gy = 100 rad	Quantité d'énergie communiquée à la matière par unité de masse
	Rad (rad)		
Equivalent de dose	Sievert (Sv)	1 Sv = 100 rem	Grandeur utilisée en radioprotection pour tenir compte de la différence d'effet biologique des divers rayonnements
	Rem		
Débit de dose absorbée	Gray par heure	1 Gy/h = 100 rad/h	Quantité d'énergie transmise à la matière par unité de masse et par unité de temps
	Rad par heure		
Débit d'équivalent de dose	Sievert par heure	1 Sv/h = 100 rem/h	Grandeur utilisée en radioprotection pour tenir compte de la différence d'effet biologique des divers rayonnements par unité de temps
	Rem par heure		

.III.3.4 - LES SOURCES DE LA RADIOACTIVITÉ

Nous sommes constamment soumis à une irradiation naturelle, dite "de base" qui provient principalement

- des rayonnements cosmiques du soleil (9 %)
- de la radioactivité de l'écorce terrestre (12 %)
- du radon qui est un gaz très présent dans les régions granitiques (40 %)
- de la radioactivité naturelle du corps humain.

A cette radioactivité naturelle vient s'ajouter la radioactivité dite artificielle que provient :

- des examens radiologiques (30 %)
- De sources diverses telles que les retombées atmosphériques (causées globalement par des essais aériens et par Tchernobyl), les écrans de télévision et d'ordinateur (l'ensemble correspond à environ 3 %).

.III.3.5 - PROTECTIONS CONTRE LES RAYONNEMENTS

IL faut d'abord se protéger d'une irradiation émise par une source extérieure au corps. L'irradiation est dangereuse seulement pendant le temps d'exposition. La contamination est plus sournoise :

- elle peut être extérieure, par dépôt de matière radioactive sur les vêtements ou la peau.
- elle peut être interne par ingestion ou inhalation de matières radioactives. La contamination se prolonge alors tant que la substance est présente.

.III.3.6 - ACTIVITE, DECROISSANCE, VIE MOYENNE, PERIODE

Au départ, le nucléide a une activité donnée. Cette activité va diminuer avec le temps. Il y aura donc décroissance de la radioactivité du radioélément. La période radioactive est

fixée comme étant le temps au bout duquel la moitié des atomes radioactifs initialement présents a disparu par transformation spontanée. Cette période varie d'un radionucléide à un autre. Le *tableau ci dessous* cite comme exemple les périodes de quelques corps radioactifs :

Table II: Exemple de période radioactive

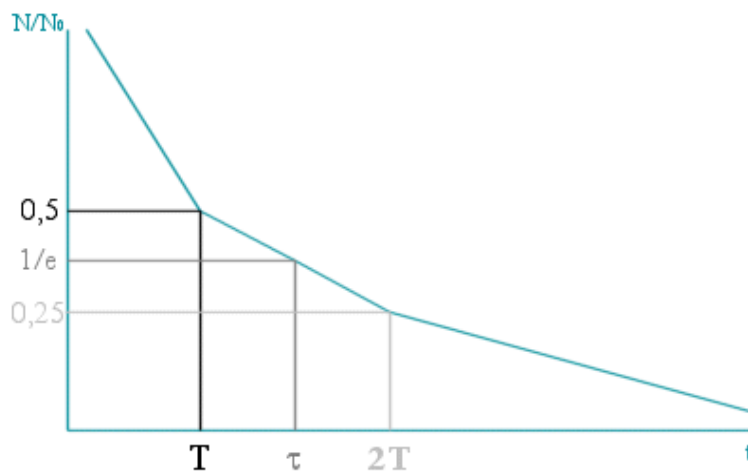
Éléments	Période radioactive
Carbone 14	5730 années
Césium 137	30,2 années
Cobalt 60	5,3 années
Iode 131	8 jours
Sodium	14,96 heures
Phosphore 32	14.3 jours

Table III : Les radioisotopes communément utilisés pour le marquage des sondes ADN ou RNA

Radioisotope	Demi-vie	Energie
^3H	12,4 ans	0,019 MeV

^{32}P	14,3jours	1,710 MeV
^{33}P	25,5 jours	0,248 MeV
^{35}S	87,4 jours	0,167 MeV
^{51}Cr	27,71 jours	

Le graphique qui suit met en évidence cette décroissance de la radioactivité, la vie moyenne et la période du radioélément :



Graphique

Figure 4 : décroissance de la radioactivité, la vie moyenne et la période du radioélément

Décroissance exponentielle d'un radioélément : N_0 atomes sont présents au temps $t = 0$. Au bout d'un temps T (la période), il n'en subsiste que la moitié ; au bout de $2T$, $1/4$ et ainsi de suite.

$$N(t) = N_0 e^{-\lambda t} \quad \text{où } \lambda = \text{constante radioactive}$$

.III.3.7 - Détecteur de rayonnement

Le compteur Geiger ou compteur Geiger-Müller (ou compteur G-M), sert à mesurer certains rayonnements ionisants (particules alpha, bêta ou gamma et rayons X, mais pas les neutrons). Cet instrument de mesure, dont le principe fut imaginé vers 1913 par Hans Geiger, fut mis au point par Geiger et Walther Müller en 1928.

✓ Description

Il est constitué d'un tube Geiger-Müller, d'un système d'amplification et d'un système d'enregistrement du signal. Le tube Geiger-Müller, une chambre métallique cylindrique dans l'axe de laquelle est tendu un mince fil métallique, est rempli d'un gaz sous faible pression. Une tension de l'ordre de 1 000 volts est établie entre le cylindre (qui fait office de **cathode**) et le fil (**anode**).

✓ Principe

Quand un rayonnement ionisant pénètre à l'intérieur du tube geiger-muller, il ionise le gaz, c'est-à-dire qu'il arrache des électrons par effet Compton. Ces électrons se multiplient très vite par avalanche électronique, dite « avalanche de Townsend », rendant le gaz conducteur pendant un temps bref (phénomène de décharge) : les électrons sont accélérés par la haute tension, percutent des molécules de gaz et provoquent ainsi d'autres ionisations en cascade.

Du fait de cette cascade, c'est un détecteur qui fonctionne en permanence en saturation. L'appareil est sensible au plus petit événement, mais le temps mort est assez important, de l'ordre de 200 microsecondes, et le détecteur sature à partir de quelques centaines de coups par secondes ; si le flux est plus important, des particules traversent le compteur sans être détectées. Par ailleurs, le facteur d'amplification est tel que toutes les impulsions sont à la hauteur maximale, il n'est pas possible de distinguer les différents types de particules.

Après amplification, le signal électrique ainsi produit est enregistré et se traduit par une indication visuelle (aiguille, lampe) ou sonore (déclat).

IV - METHODOLOGIE

IV.1 - LIEU D'ETUDE :

Les échantillons traités au laboratoire du MRTC provenaient de Pongonon.



Source :MRTC

Figure 5 : site d'étude

Pongonon est un village d'environ 1350 habitants (recensement MRTC 2007) situé à 789 km de Bamako dans le nord-est du Mali en cinquième région dans le cercle de Koro. Le paludisme y est endémique avec une saison de transmission allant de juillet à octobre.

IV.2 - TYPE ET PERIODE D'ÉTUDE

Nous avons réalisé une étude comparative de deux techniques sur une période allant de septembre 2006 à décembre 2006.

IV.3 - POPULATION D'ETUDE

Notre étude a concerné les patients atteints de paludisme simple à *P. falciparum* et âgés de 6 mois et plus ayant consulté pendant la période de l'étude.

IV.4 - ECHANTILLONAGE

Nous avons effectué un tirage aléatoire d'échantillons. Un total de 192 échantillons ont été traités.

IV.5 - DONNEES BIOLOGIQUES

Il s'agissait de l'ADN extrait à partir des prélèvements de sang veineux. Les prélèvements sont confirmés positifs à *Plasmodium falciparum* par microscopie optique.

IV.6 - CONSIDERATIONS ETHIQUES

Le protocole de recherche de l'étude a reçu l'approbation du comité d'éthique institutionnel de la faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie de l'Université de Bamako. Le consentement communautaire et celui individuel ont été également obtenu sur le terrain avant les inclusions. La participation à l'étude était totalement volontaire et aucun sujet n'a été inclus contre son gré. Une fiche d'assentiment a été signée pour chaque patient et les personnes signataires étaient le parent ou personne responsable de l'enfant, le témoin et l'investigateur.

IV.7 - TECHNIQUES DE LABORATOIRE

.IV.7.1 - Technique De La Polymerase Chain Reaction ou Technique d'amplification génique/PCR- RFLP

IV.7.1.1 - Principe

Cette technique décrite en 1986 (K. MULLIS et collaborateurs) permet d'amplifier des séquences d'ADN de manière spécifique et d'augmenter de manière considérable la quantité d'ADN dont on dispose initialement. Elle nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent l'ADN à amplifier. Ces séquences serviront à synthétiser des amorces oligonucléotidiques complémentaires (de longueur de 20 à 30 nucléotides en général). Ces oligonucléotides serviront à délimiter la portion d'ADN à amplifier. L'ADN polymérase les utilisera comme amorces.

IV.7.1.2 - Extraction de l'ADN

Le kit nucléon a été utilisé pour extraction d'ADN des échantillons.

Méthode d'extraction au Nucléon Kit

✓ Matériel et réactifs

- 1- bloque chauffante ou bain-marie
- 2- thermomètre
- 3- vortex
- 4- éthanol pur, éthanol 70%
- 2- Gants,
- 4- Pipettes de 2, 10, 100 et 1000 µl,
- 5- Embouts de 10, 100 et 1000 µl,
- 6- Tubes de 200µl ou 500 µl,
- 7- Tubes de 1500 µl,
- 8- Marqueurs à bout fin indélébile,
- 9- Portoir (tubes et pipettes),
- 10- Blouses
- 11- Poubelle.
- 12- Kit nucleon (réactif A, réactif B, perchlorate de sodium, la résine)
- 13-chloroforme, solution 1XTE, PBS

✓ Mode opératoire

- 1-Décongeler le sang en laissant les échantillons a température ambiante pendant 20 minutes
- 2-Transférer le sang dans un tube de 15 ml. Ajouter du PBS afin de standardiser les volumes a celui du grand (1ml au moins)
- 3-Ajouter 4X le volume du réactif A
- 4-Agiter le tube plusieurs fois et vortexer pendant 5 minutes
- 5-Centrifuger à 3000 rpm pendant 15 minutes
- 6-Verser le surnageant dans un bocal contenant une solution désinfectante de type eau de javel et verser doucement le reste du surnageant sur le papier buvard. Faire attention de ne pas décoller le culot
- 7-Si le culot est plus de 300 µl en volume, resuspendre dans un volume de 2 ml du réactif A et répéter les étapes de la lyse des cellules
- 8-Si le culot est (jaune pale et compact), ajouter 350 µl du réactif B (SDS). Remuer le SDS avec la pipette et resuspendre le culot. Soyez sur que le lysat est homogène avant de le transférer dans un nouveau tube eppendorf, Incuber le lysat cellulaire homogène a 37° C pendant 30 minutes et vortexer de temps a temps pour dissoudre toute particule solide.
- 9-Ajouter 100 µl de perchlorate de sodium, mélanger gentiment avec les mains et incuber à 65° C pendant 20 minutes,
- 10-Ajouter 600 µl de chloroforme et agiter vigoureusement les mains.
- 11-Centrifuger à faible vitesse (2000rpm) pendant 2 minutes
- 12-Si le surnageant est clair, ajouter 150 µl de résine et sans mélanger, centrifuger pendant 2 minutes, transférer le surnageant est clair dans un nouveau tube eppendorf
- 13-Si le dessus du surnageant n'est pas clair, transférer dans un nouveau tube eppendorf et répéter les étapes 10 à 11 une ou plusieurs fois jusqu'à ce que le surnageant devienne clair.
- 14-Centrifuger le surnageant clair à vitesse supérieure pendant 5 secondes pour enlever toute trace de résine. Transférer le surnageant dans un nouveau tube.
- 15- Ajouter 900 µl d'éthanol pur congelé et inverser le tube plusieurs fois jusqu'à ce que l'ADN précipité.
- 16- Centrifuger à vitesse supérieure pendant 10 minutes

17-Verser l'éthanol avec précaution

18- Ajouter 950 µl d'éthanol 70% congelé pour laver l'ADN. Vortexer pendant plusieurs secondes afin de bien mélanger.

19- Centrifuger à vitesse supérieure pendant 5 minutes. Verser l'éthanol. Centrifuger pendant 5 secondes et enlever toute trace d'éthanol avec une pipette.

20-Laisser le tube ouvert pendant 20 minutes pour séchage du culot d'ADN.

21-Ajouter 200 µl de TE 1X et resuspendre à 4° C pendant toute la nuit.

22-l'extrait ainsi obtenu peut être utilisé immédiatement ou gardé à + 4° C ou -20° C

✓ **Contrôle de qualité :**

Respecter rigoureusement le protocole d'extraction et tester le solvant d'extraction comme un témoin négatif au cours de la PCR d'essai. Contrôler la température en sorte que les aérosols ne passent d'un tube à un autre entraînant une inter- contamination.

IV.7.1.3 - Amplification

- aPrincipe

Il s'agit de procéder à l'identification des nucléotides du codon 76 de pfcrt par double PCR suivie d'une restriction enzymatique.

- bMatériel et réactifs

Buffer PCR(+ MgCl₂), 10xdNTPs, Taq polymérase, Eau pour PCR, Bovine Sérum Albumine (BSA), NEB Buffer de digestion, Enzyme de digestion ApoI, des gants , Tubes (1,5ml, 0,5ml, 0,2ml), Thermocycleur, ADN, Centrifugeuse, pipettes et embouts (1000µl, 200µl, 20µl et 10µl), portoirs, marqueurs, bain marie ou incubateur ; témoins sauvages (3D7, Sud 106/1), témoins mutants (Dd2 ,7G8).

Amorces :

Première amplification:

CRT-P1 : CCGTAAATAATAAATACACGCAG

CRT-P2 : CGGATGTTACAAAACACTATAGTTACC

Deuxième amplification:

CRT-D1: TGTGCTCATGTGTTTAAACTT

CRT-D2: CAAAACCTATAGTTACCAATTTTG

- c Première amplification

Technique

- Identifier les tubes de 200 ou 500 µl conformément aux numéros des échantillons à traiter
- Préparer le Master MIX dans un tube 1,5ml en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction selon le tableau IV
- Repartir dans chaque tube identifié 20µl de Master MIX
- Ajouter 5 µl d'ADN extrait au Nucleon dans chaque tube correspondant
- Centrifuger brièvement les tubes
- Placer les tubes bien fermés dans le thermocycleur pour l'amplification avec le programme approprié (Tableau V)
- Faire l'électrophorèse sur gel d'agarose à 2%.
- Faire la photo du gel
- Interpréter la photo.

Table IV: Composition du Master MIX pour la première amplification

Composant	Concentration finale	Volume par réaction en µl
H2O	√	12,125
5X buffer 12.5 Mg	1X (2.5mM Mg++)	5
10X dNTPs	1X (200 µM)	2,5
100X Amorces	1X (1 µM)	0,25
CRT-P1+CRT-P2		
Taq Polymerase (5U/ µl)	0,025 u	0,125
TOTAL*	√	20

- Pour un volume total de 25 µl, ajouter 5ul d'ADN et 1ul d'ADN+4 µl d'eau pour les témoins.

Table V: Programme de la première amplification

Température	Temps
-------------	-------

1	Dénaturation initiale	94°C	3 min
2	Dénaturation	94°C	30 secs
3	Hybridation	56°C	30 secs
4	Extension	60°C	1 min
5	Retourner à l'étape 2, 44 fois		
6	Extension finale	60°C	3 min
7	Fin du programme	4°C	Infini

- dDeuxième amplification :

Inscrire le numéro du tube de la première amplification sur le tube de la 2^e amplification;
Préparer le Master MIX pour la 2^e amplification en fonction du nombre d'échantillons à traiter selon le tableau VI

Repartir dans chaque tube 24 µl de Master MIX;

Ajouter 1µl du produit de la 1^{ère} amplification dans chaque tube correspondant;

Centrifuger brièvement les tubes

Placer les tubes bien fermés dans le thermocycleur pour la 2^e amplification suivant le programme approprié (tableau VII).

Faire l'électrophorèse sur gel d'agarose avant de passer à la digestion

Faire la photo du gel

Interpréter la photo

Table VI : Composition du Master MIX pour la deuxième amplification

Composants	Concentrations finales	Volume par réaction en µl
H2O	√	16,125
5X buffer 12.5 Mg ⁺⁺	1X (2.5mM de Mg ⁺⁺)	5
10X dNTPs	1X (100 µM)	2,5
100X Amorces	1X (1 µM)	0,25
CRT-D1+CRT-D2		

Taq Polymerase (5U/ µl)	0,025 u	0,125
TOTAL*	√	24

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

Table VII: Programme de la deuxième amplification

	Etapes	Température	Temps
1	Dénaturation initiale	95°C	5 min
2	Dénaturation	92°C	30 secs
3	Hybridation	48°C	30 secs
4	Extension	65°C	1 min
5	Retourner à l'étape 2, 24 fois		
6	Extension finale	65°C	3 min
7	Fin du programme	4°C	Infini

IV.7.1.4 - Digestion :

Sélectionner les échantillons ayant donné de bonnes bandes

Inscrire sur les tubes les numéros des différents échantillons ;

Préparer le Master MIX de digestion (tableau VIII) ;

Distribuer dans chacun des tubes correspondants 15 µl du Master MIX de digestion;

Ajouter 5 µl du produit de la 2^e amplification dans les tubes correspondant et les fermer ;

Centrifuger brièvement

Mettre les tubes dans l'incubateur ou le bain marie ou les plaques chauffantes. La digestion se fait à une température de 50°C pendant 6 heures au minimum.

Procéder à l'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% ou placer à + 4°C dans un réfrigérateur.

Faire la photo du gel

Interpréter la photo

Table VIII: Composition du Master MIX de digestion

REACTIFS	Volume par réaction en μl
10X BUFFER N°3	2
BSA	0,2
ENZYME (Apo 1)	0,25
H2O	12,55
TOTAL*	15

* Pour un volume total de 20 μl , ajouter 5ul du produit de la deuxième amplification.

IV.7.1.5 - Interprétation des résultats

Etiqueter la photo et reporter les résultats dans un registre.

Une bonne réaction se traduit par la présence de bandes conformes à celles attendues.

Il faut observer la conformité de la taille du produit attendu ainsi que celle des témoins positifs.

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

La taille attendue pour les produits d'amplifications est de 537 pb pour la 1^{ère} amplification et de 134 pb pour la 2^e.

L'enzyme ne coupe que les souches de génotypes sauvages. Les bandes de la même taille que le témoin sauvage (100pb) correspondent aux souches sauvages. Par contre celles qui ont la même taille que le témoin mutant (134pb) correspondent aux souches mutantes. Les échantillons présentant à la fois les deux bandes (sauvage et mutante) correspondent aux souches mixtes.

134 pb

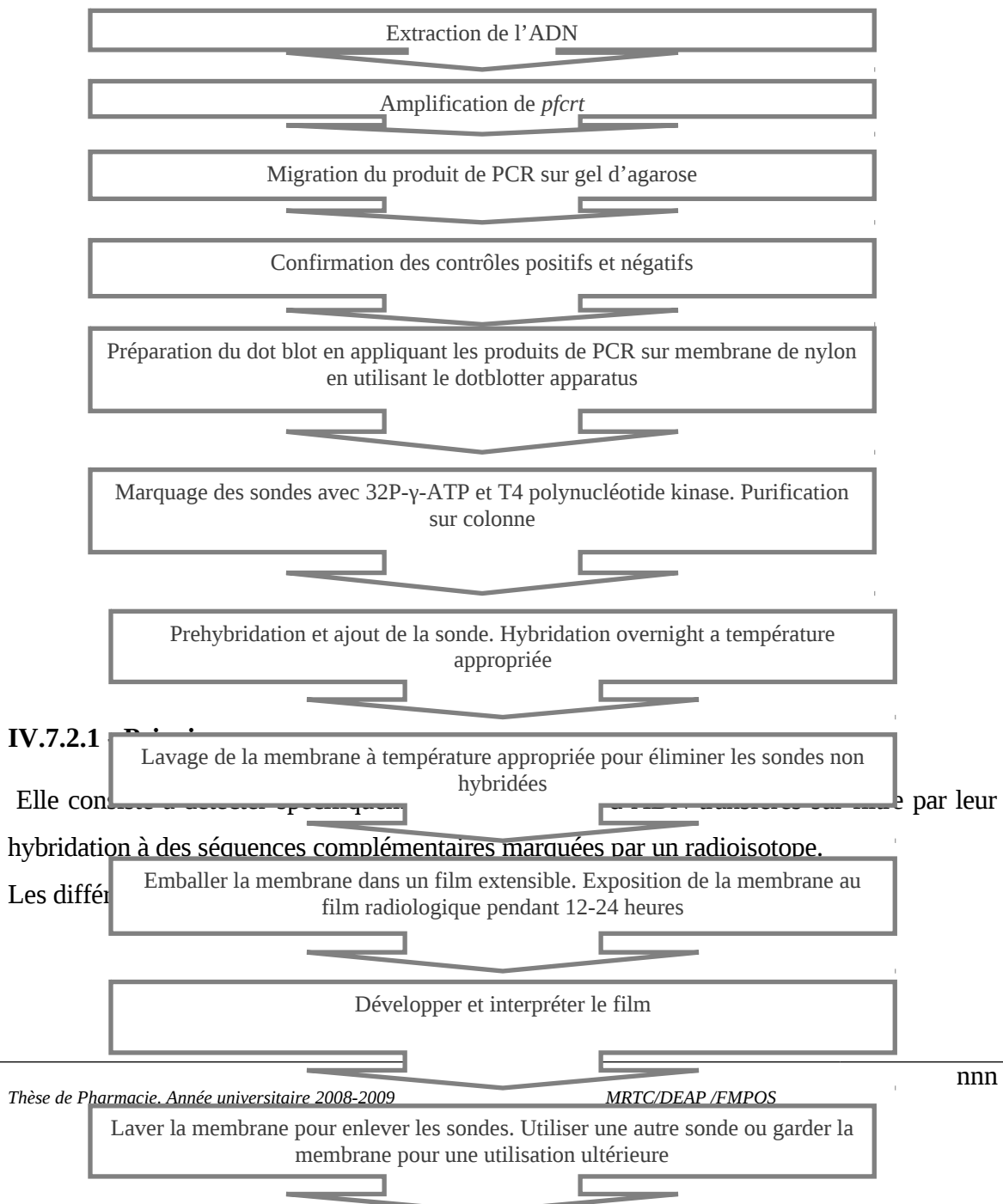
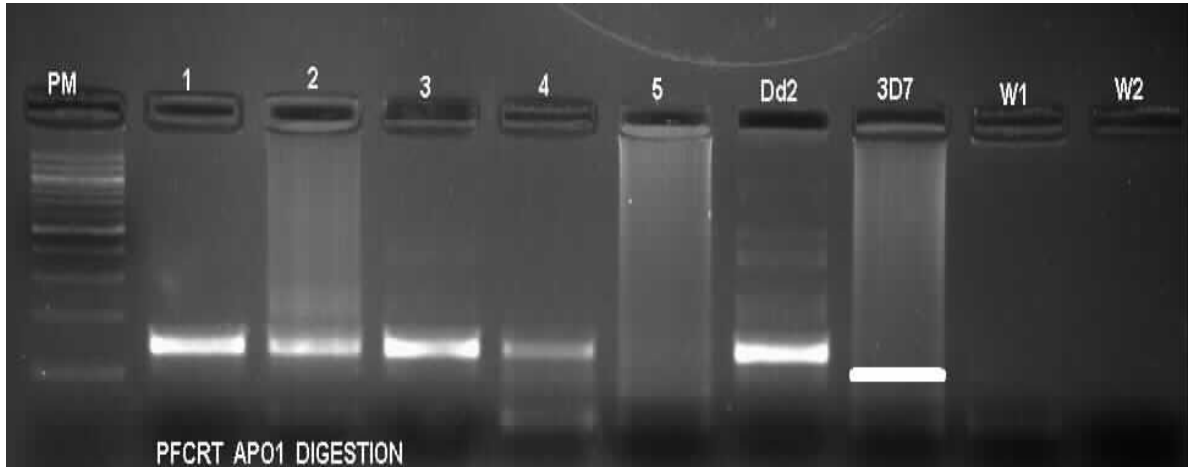


Figure 7 : étapes du dot blot

IV.7.2.2 - Modes opératoires

.IV.7.2.2.1 - Préparation de la membrane pour la technique du Dot Blot

- aOBJET

Fixer les ADN dénaturés sur une membrane de nylon pour la technique du DOT BLOT

- b Principe

Il s'agit de dénaturer les amplicons de la PCR (double brin d'ADN) puis de les fixer sur une membrane de Nylon.

- cMatériel et réactifs

- 1- 0,1M EDTA (pH=8) (autoclavée)
- 2- 4M NaOH
- 3- 2M Ammonium acétate (autoclavée)
- 4- Eau stérile DNase RNase free (eau autoclavée)
- 5- 1mM EDTA buffer (TE buffer) ou
- 6- 2X SSC (autoclavée)
- 7- 0,4M NaOH
- 8- Solution de neutralisation : 1M Tris-Cl⁺ 1,5M NaCl (autoclavée)
- 9- Tube Eppendorf stérile 0,5/ 0,2ml
- 10- Membrane de Nylon (**Genescreen, cat # : NEF983 from NEN life science products**)
- 11- Papier filtre
- 12- Dot-blot apparatus (BioRad UK dotblotter)
- 13- Centrifugeuse
- 14- Bain-marie ou Bloc chauffant
- 15- Pipettes e Tips stérile
- 16- Forceps
- 17- Appareil UV
- 18- Plaque de verre rectangulaire ou carrée
- 19- Gants, Blouse

- d Mesure de Sécurité et Précautions

- 1- Porter des gants et une blouse pendant toute la durée de la procédure. Ne jamais toucher la membrane avec des doigts non ganté.
- 2- Nettoyer la paillasse et ne jamais déposer la membrane directement sur la paillasse

- e Technique

Se rassurer que les contrôles minimum pour le génotypage de *pfcr* disponibles actuellement ci-dessous ont été amplifiés. En effet sur les 8 combinaisons possibles seulement 4 contrôles sont disponibles.

Table IX: Contrôles pour *pfcr*

Clone	Combinaison de sonde 74/75/76			
	Met/Asn/Lys	Met/Asn/Thr	Ile/Glu /Thr	Ile/Glu /Lys
	MNK	MNT	IET	IEK
3D7	✓			
Dd2			✓	
7G8		✓		
Sud106/1				✓

- 1- Centrifuger les produits de PCR
- 2- Labeller convenablement de nouveaux tubes Eppendorf
- 3- Préparer le Mix de dénaturation comme suit :

Table X: Mix de dénaturation

REACTIFS	VOLUME POUR 1 TUBE
0,1M EDTA3µl
4M NaOH3µl
Eau stérile4µl
Total	10µl

- 4- Ajouter **10µl** du Mix de dénaturation dans chaque tube nouvellement labellé
- 5- Ajouter **20µl** du produit de PCR dans le nouveau tube correspondant
- 6- Centrifuger les tubes
- 7- Chauffer les tubes à 100°C pendant 10 minutes pour une dénaturation complète
- 8- Centrifuger les tubes
- 9- Ajouter le volume équivalent en Ammonium Acétate 2M, pH=7 (**30 µl**)
- 10- Garder les produits dénaturés à 4°C le temps de préparer le Dotblotter.
- 11- Etablir une maquette pour le transférer du produit dénaturer dans le Dotblotter
- 12- Couper 2 papiers filtre et la membrane de Nylon de dimension 8cm sur 12
- 13- Tremper les papiers filtre (8/12cm) dans du TE ou du 2X SSC
- 14- Placer les papiers trempés dans le Dotblotter comme l'indique le manuel d'utilisation.

- 15- Tremper la membrane de nylon (8/12cm) dans du TE ou 2X SSC
- 16- Déposer la membrane sur les papiers filtre placé dans le Dotblotter
- 17- Fermer le Dotblotter comme l'indique le manuel d'utilisation.
- 18- Ajouter 200 µl de TE ou de 2X SSC dans chaque puits du Dotblotter
- 19- Appliquer délicatement le vacuum
- 20- Transférer les produits dénaturés dans les puits du Dotblotter en respectant la maquette préalablement établit.

NB : les échantillons doivent impérativement être déposés en double.

- 21- Laisser reposer 30 minutes
- 22- Appliquer le vacuum délicatement
- 23- Avant de retirer la membrane, y inscrire à l'aide d'un crayon à papier la date, le nom du gène et le nom du "blot".
- 24- Marquer rapidement les spots s'ils sont visibles
- 25- Retirer la membrane
- 26- Tremper la membrane dans du 2X SSC pendant 30-60 secondes (neutralisation)
- 27- Retirer la membrane et la tremper dans du 0,4M NaOH (dénaturation)
- 28- Retirer la membrane et la tremper dans la solution de neutralisation (1M Tris-Cl + 1,5M NaCl, pH=8)
- 29- Placer la membrane sur le support de verre
- 30- Exposer la membrane (face de l'ADN) à l'UV pendant 5 min
- 31- Laisser sécher la membrane à température ambiante à l'abri
- 32- Placer la membrane entre deux papiers filtre propre et y inscrire la date, le nom du gène, la surface de la membrane et le numéro du 'blot'

Remarque : La membrane peut être utilisée directement après exposition à UV sans être séchée. Elle peut être également conservée à -20°C ; pour cela après exposition à l'UV, emballer la membrane dans un film transparent.

- f Utilisations

La membrane sera utilisée pour la détection des points de mutations par application de sondes radiomarquées.

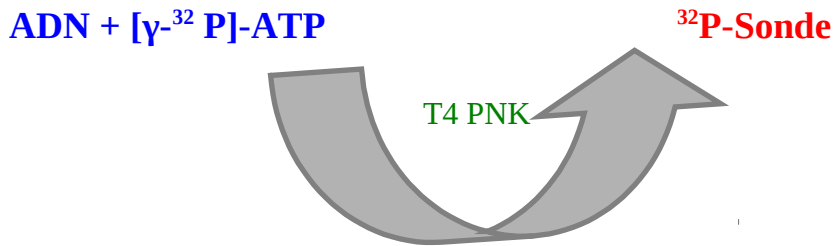
.IV.7.2.2.2 - Marquage de la sonde par le ^{32}P et purification de la sonde radiomarquée

- aObjet

Marquage des oligonucléotides (sondes) avec du phosphore radioactif (^{32}P) pour la technique du DOT BLOT

- b Principe

Il s'agit de transférer Phosphore 32 radioactif d'une molécule d'ATP en position 5' d'un ADN sous l'action d'une enzyme T4 Polynucléotide kinase (Ready-To-Go™ T4 Polynucléotide Kinase). En effet la polynucléotide kinase catalyse le transfert du phosphate de l'ATP (Phosphore radioactif) sur une fonction alcool du carbone 5' de l'ADN.



- cMatériel et réactifs

Table XI: Séquences des sondes de *pfcr1* 74, 75,76

PfCRT76 IEK -	5'-TAA TTG AAA AAA TTT TTG-3'
PfCRT76 IET -	5'-TAA TTG AAA CAA TTT TTG-3'
PfCRT76 MNK-	5'-TAA TGA ATA AAA TTT TTG-3'
PfCRT76 MNT -	5'-TAA TGA ATA CAA TTT TTG-3'
PfCRT76 MEK -	5'-TAA TGG AAA AAA TTT TTG-3'
PfCRT76 MET -	5'-TAA TGG AAA CAA TTT TTG-3'
PfCRT76 INK -	5'-TAA TTA ATA AAA TTT TTG-3'
PfCRT76 INT-	5'-TAA TTA ATA CAA TTT TTG-3'

1- Oligonucléotide diluée à 10 μM dans de l'eau stérile.

- 2- Ready-To-Go™ T4 Polynucleotide Kinase (**Amersham Biosciences, UK, Cat # 27073701**)
- 3- [γ -³²P] ATP (**Amersham Biosciences, UK, Redivue [γ -³²P] ATP, 3000 Ci/mmol: Cat # AA00068**)
- 4- Eau stérile DNase RNase free
- 5- 250mM EDTA
- 6- Equipement de protection contre la Radioactivité
- 7- Tube Eppendorf (1,5 ml)
- 8- Bain-marie ou bloc chauffant (37°C)
- 9- Pipettes et Tips
- 10- Microspin, G-25 columns (**Amersham Biosciences, UK, Cat # 27532501**)
- 11- Centrifugeuse
- 12- Gants, Blouse

- d Mesure de Sécurité et Précautions

- 1- Porter des gants et une blouse pendant toute la durée de la procédure.
- 2- Vérifier que tous le matériel de protection est disponible avant de commencer à manipuler la radioactivité.
- 3- Vérifier que l'environnement n'est pas radioactif à l'aide du Bêta compteur avant et après toute manipulation de la radioactivité.
- 4- Lors de la manipulation de la radioactivité, porter deux paires de gants et le badge.
- 5- Nettoyer la paillasse avant et après manipulation de la radioactivité.

- e Technique

Pour chacune des sondes à radiomarquer :

- 1- Ajouter 25 μ l d'eau stérile dans le tube contenant l'enzyme Ready-To-Go T4PNK.

NB : Faire attention de ne pas pipeter le lyophilisat d'enzyme en ajoutant les 25 μ l d'eau

- 2- Laisser incuber à température ambiante 2-5 minutes
- 3- Libeller lisiblement le nom de la sonde sur le couvercle et sur la longueur du tube
- 4- Ajouter 5-10 pmol de l'oligonucléotide et de l'eau dans les proportions suivante :

Table XII: Préparation de Mix

REACTIFS	VOLUME POUR 1 TUBE
Ready-To-Go T4 PKN25µl
10µM oligonucléotide1µl
Eau stérile23µl
Total	49µl

5- Vortexer le mélange puis centrifuger

Partant de cette étape, toutes les autres manipulations doivent être effectuées dans la pièce réservée à la manipulation de produit radioactif. Doubler les gants et porter le badge, s'assurer que l'environnement de travail n'est pas contaminé à l'aide du Bêta compteur.

6- Ajouter 1µl du [γ - ^{32}P] ATP

7- Mélanger délicatement et centrifuger brièvement

8- Incuber à 37°C pendant 30 minutes

9- Ajouter 5 µl d'EDTA 250mM pour stopper la réaction.

Remarque : A cette étape le volume total est de 55 µl ; Pour le calcul de la radiation utilisée et restante on retiendra que :

- Les 25µl de « Redivue [γ - ^{32}P] ATP » à une activité de 9,25 MBq.

- Pour marquer une sonde nous utilisons 1µl soit une activité de 0,37 MBq.

*Ainsi les 55µl du mélange Enzyme- Oligonucléotide - [γ - ^{32}P] ATP ont une activité de **0,37 MBq.***

*Il restera donc dans le tube de « Redivue [γ - ^{32}P] ATP » une activité de (9,25 – 0,37) soit **8,88 MBq***

10- Resuspendre la colonne de résine en vortexant délicatement

11- Placer le tube dans un tube Eppendorf 1,5ml

- 12- Dévisser légèrement le couvercle de la colonne
- 13- Centrifuger le dispositif à 3000 rpm pendant 1 min
- 14- Placer la colonne de résine ainsi centrifugée dans un nouveau tube Eppendorf 1,5ml labellé convenablement et lisiblement (Nom de la sonde, date)
- 15- Ajouter les 55µl de la mixture radioactive (*Enzyme- Oligonucléotide - [γ -³²P] ATP*) au centre de la surface du lit de résine compacte, en prenant soin de ne pas mélanger ce dernier.
- 16- Centrifuger à 3000 rpm pendant 2 min
- 17- Placer la colonne de résine dans la poubelle des déchets solides radioactifs
- 18- Récupérer le produit de centrifugation (environ 45µl) et vérifier la radioactivité avec le Bêta compteur
- 19- Utiliser immédiatement ou conserver à -20°C pour un maximum de 2-4 semaines.

Remarque : A cette étape pour le calcul de la radiation déposer dans la poubelle des solides et liquides radioactifs on retiendra que :

- les 2/3 des 0,37 MBq soit **0,25 MBq** sera retenue par la colonne de résine (=>déchets radioactifs solides).
- les 1/3 des 0,37 MBq soit **0,15 MBq** aura été utilisé pour marquer la sonde (=>déchets radioactifs liquides).

- f Utilisations

La sonde radioactive sera utilisée pour marquée spécifiquement les brins d'ADN fixée sur la membrane et permettre ainsi l'identification du génotype du gène analysé.

.IV.7.2.2.3 - Hybridation de la sonde radioactive et lavage de la membrane

- aObjet

Hybrider spécifiquement les sondes radioactives aux brins d'ADN fixées sur la membrane et exposer cette membrane à un film.

- b Principe

Il s'agit d'hybrider la sonde radiomarquée aux brins d'ADN fixés sur la membrane de Nylon. La membrane est soumise à une série de lavage et exposé à un film photosensible.

- c Matériel et réactifs

- 1- Solution d'Hybridation
- 2- Solution de lavage 1 : 2X SSC
- 3- Solution de lavage 2 : 1X SSC + 0,1% SDS
- 4- 0,1M NaOH
- 5- 5X SSC
- 6- Sonde radioactive
- 7- Glogos II markers
- 8- Film élastique transparent (Cling Film)
- 9- Forceps pour membrane
- 10- Equipement de protection contre la radioactivité
- 11- Incubateur d'hybridation et accessoires
- 12- Pipettes et Tips
- 13- Cassettes d'autoradiographie avec écran d'intensification
- 14- Film KODAK et équipement pour développement
- 15- Gants, Blouse

- d Mesure de Sécurité et Précautions

- 1- Porter des gants et une blouse pendant toute la durée de la procédure.
- 2- Vérifier que tout le matériel de protection est disponible avant de commencer à manipuler la radioactivité.
- 3- Vérifier que l'environnement n'est pas radioactif à l'aide du Bêta compteur avant et après toute manipulation de la radioactivité.
- 4- Lors de la manipulation de la radioactivité, porter deux paires de gants et le badge.
- 5- Nettoyer la paillasse avant et après manipulation de la radioactivité.

- e Technique

La température, les conditions d'hybridation et les lavages sont spécifiques de la sonde utilisée. La température d'hybridation peut varier d'un incubateur à un autre ; il est donc important d'optimiser la réaction avant de commencer les grandes séries d'analyses.

Toutes les manipulations, à l'exception de l'exposition et du développement du film, doivent être effectuées dans la pièce réservée à la manipulation des produits radioactifs. Doubler les gants et porter le badge, s'assurer que l'environnement de travail n'est pas contaminé à l'aide du Bêta compteur.

- 1- Placer la membrane dans la bouteille d'hybridation.
- 2- Ajouter **0,25-0,125ml/cm²** de la solution d'hybridation :

Exemple : Pour une membrane qui mesure 8cm sur 12 cm, soit une surface de 96cm² on utilisera 96cm²x 0,125 ou 0,25 = 12- 24 ml de solution d'hybridation.

Conventionnellement on utilise 15ml pour une membrane de 96 cm²

- 3- Incuber à la température correspondante à la sonde utilisée pendant 30 minutes.

NB : S'assurer que la bouteille est bien fermée

- 4- Ajouter la sonde radioactive à raison de 1µl/ml de solution d'hybridation, soit 12-24µl

Conventionnellement on utilise 15µl pour une membrane de 96 cm².

Remarque : Les 45µl de la sonde radioactive ont une activité de 0,15MBq ; Ainsi 15 µl auront une activité de 0,05 MBq (= >déchets radioactifs liquides).

- 5- Laisser incuber à la température indiquée pour la sonde utilisée pendant **5h** ou toute la nuit pour un meilleur résultat.

Table XIII: Condition d'hybridation et de lavage

CONDITIONS D'HYBRIDATION ET DE LAVAGE

GENE	Nom des sondes	Température d'hybridation	1er lavage:		2ème et 3ème lavage	
			2X SSC		1XSSC/ 0.1%SDS	
			Temp (°C)	Temps	Temp (°C)	Temps
PFCRT	PfCRT76 IEK -specific	37°	37°	20 minutes	37°	10 minutes
	PfCRT76 IET -specific	40°	40°	20 minutes	40°	10 minutes
	PfCRT76 MNK-specific	37°	37°	20 minutes	37°	10 minutes
	PfCRT76 MNT -specific	40°	40°	20 minutes	40°	10 minutes
	PfCRT76 MEK -specific	37°	37°	20 minutes	37°	10 minutes
	PfCRT76 MET -specific	37°	37°	20 minutes	37°	10 minutes
	PfCRT76 INK -specific	37°	37°	20 minutes	37°	10 minutes
	PfCRT76 INT-specific	37°	37°	20 minutes	37°	10 minutes

- 6- Verser la solution d'hybridation radioactive
- 7- Ajouter **100ml** de la solution de lavage 1 et incuber à la température d'hybridation pendant **20 minutes**.
- 8- Verser le contenu de la bouteille
- 9- Ajouter **100ml** de la solution de lavage 2 et incuber à la température d'hybridation pendant **10 minutes**.
- 10- Verser le contenu de la bouteille
- 11- Ajouter **100ml** de la solution de lavage 2 et incuber à la température d'hybridation pendant **10 minutes**.
- 12- Verser le contenu de la bouteille
- 13- Emballer la membrane dans le film plastic transparent
- 14- Placer la membrane dans la cassette d'autoradiographie
- 15- Dans la chambre noire, à défaut d'une lumière filtrée adaptée travailler dans l'obscurité complète
- 16- Placer le film dans la cassette

- 17- Placer la cassette à -70°C pour **12-24 heures**.
- 18- Enlever le film de la cassette.
- 19- Développer le film et reporter les résultats

Remarque : Si nécessaire un autre film peut être exposé pendant une durée plus longue pour la détection de faibles spots.

Si certains contrôles sont non spécifiques, répéter les étapes 11 à 19

- 20- Placer la membrane dans une bouteille d'hybridation
- 21- Ajouter un excès de NaOH 0,1M (**100 ml** pour une membrane de 96cm²)
- 22- Incuber à température ambiante **15 minutes**
- 23- Verser le contenu de la bouteille
- 24- Répéter l'étape 22
- 25- Laver brièvement (**5 minutes**) avec du SSC 5X (**50ml** pour une membrane de 96cm²)
- 26- Utiliser la membrane immédiatement pour une nouvelle expérience ou laisser la sécher à température ambiante à l'abri de la poussière, ou encore emballer la dans un film plastique transparent et conserver à -20°C .

f-Report et interprétation des résultats

Après le développement du film autoradiographique, on obtient les résultats que montre la figure 8 :

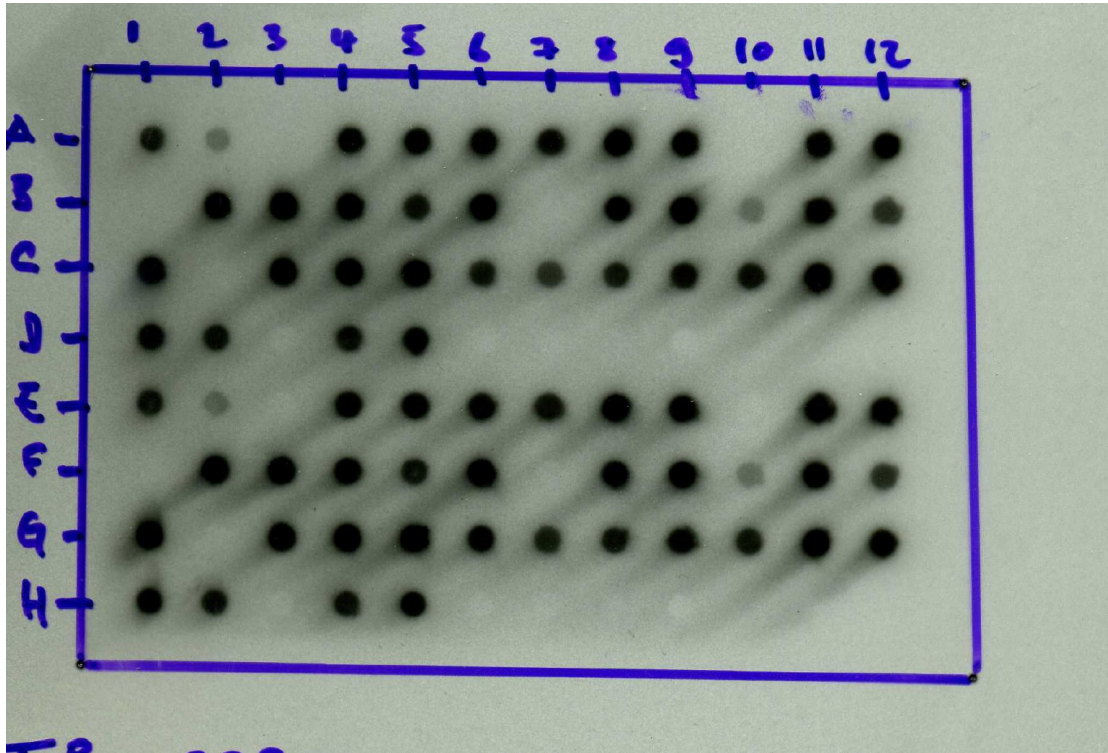


Figure 8 : Autoradiographie

Source : MEDRU/MRTC 2007

Interprétation :

La validation du résultat est fonction de la spécificité de l'hybridation. Cela signifie qu'il faut l'absence de spot au niveau des témoins non spécifiques et des témoins négatifs.

- ✓ les spots représentent les échantillons qui portent l'haplotype recherché (exemple MNK)
- ✓ la présence du spot du contrôle positif (D5 et H5 spot 3d7)
- ✓ l'échantillon A3 ne porte pas le MNK
- ✓ D6, D7, D8 sont des témoins MNT, IEK, IET (absence de signal d'appariement)

IV.8 - CALCUL DU COÛT

Le calcul du cout a été fait à partir des prix donnés par les fournisseurs locaux et des factures. Il ne prend pas en compte les amortissements des équipements et les efforts fournis lors de la manipulation.

Les calculs ont porté sur les réactifs et les consommables de laboratoire. Cette estimation du coût ne tient pas compte du prix de l'extraction d'ADN.

IV.9 - TEMPS DE REALISATION

.IV.9.1 - PCR-RFLP

Le protocole de PCR décrit dans la section technique de laboratoire a été utilisé pour l'estimation du temps de réalisation. Le temps pour l'extraction de l'ADN n'a pas été inclus. Le calcul a été fait sur le temps d'amplifications, de restriction enzymatique et de révélation.

.IV.9.2 - Dot blot

Le protocole de dot blot décrit dans la section technique de laboratoire a été utilisé pour l'estimation du temps de réalisation. Le temps pour l'extraction de l'ADN n'a pas été inclus. Il a porté sur la préparation de la membrane, le marquage et la purification de la sonde, l'hybridation et la révélation.

IV.10 - ANALYSE DES DONNÉES :

Les données ont été saisies sur Excel et ont été analysées à l'aide du logiciel SPSS version 11.0 for Windows. Le test de Chi² a été utilisé pour la comparaison des variables qualitatives.

V - RÉSULTATS

Au total 192 échantillons ont été traités avec succès par la RFLP et par le Dot Blot.

V.1 - PREVALENCE

Le tableau XIV montre une prévalence de la mutation 76T de *Pfcr*t de 33,3% à Pongonon par la technique PCR-RFLP.

Tableau XIV : Prévalence de la mutation 76T de *Pfcr*t à Pongonon par PCR-RFLP

génotypes	N	%
sauvage	128	66,7
mutant	64	33,3
<i>Total</i>	192	100

Le tableau XV montre une prévalence de la mutation 76T de *Pfcr*t de 59,4% à Pongonon par le dot blot.

Table XV: Prévalence de la mutation K76T de *Pfcr*t à Pongonon par Dot Blot

génotypes	N	%
sauvage	78	40,6
mutant	114	59,4
Total	192	100

Le tableau XVI montre qu'il y a une différence statistiquement significative entre les résultats données par chacune des deux méthodes ($p= 10^{-8}$).

Table XVI: Comparaison des résultats de PCR-RFLP et de Dot Blot à Pongonon

Génotypes	PCR-RFLP N (%)	DOT BLOT N (%)
K	128 (66,7)	78 (40,6)
T	31 (16,1)	13 (6,8)
K+T	33 (17,2)	101 (52,6)
Total	192 (100)	192 (100)

Le tableau XVII montre que 52,6% des infections à *Plasmodium falciparum* à Pongonon sont des cas de mixtes. Les haplotypes y rencontrés sont MNK et IET.

Table XVII: Prévalence des haplotypes de pfcrt (74-76) à Pongonon

Haplotypes	N	%
MNK	78	40,6
MNT	0	0
IEK	0	0
IET	13	6,8
MNK+IET	101	52,6
INK	0	0
INT	0	0
MET	0	0
MEK	0	0
Total	192	100

Table XVIII: Détection des infections polyclonales

Techniques	Proportions infections polyclonales
	N=192
PCR-RFLP	33(17,18%)
Dot blot	101(52,60%)

La technique de dot blot détecte plus de mixtes que la RFLP. La différence est statistiquement significative ($p < 0.01$)

V.2 - LE COÛT

Ce tableau XIX donne le coût des matériels et réactifs nécessaires pour le marquage et la purification d'une sonde de dot blot soit 177566,1 FCA.

Table XIX : Marquage et purification d'une sonde

Réactifs+consommables	Quantité requise	prix qsp	Description	Prix unitaire en FCFA
Oligonucléotides 10 μ M	1 μ l	161050	tube	161050
Ready-To-Go	1tube	5779,905	paquet 21 tubes	121378
gamma-32P	1 μ l = 3essais	4324,98	flacon 25 μ l	327650
250mMEDTA	5 μ l =0,37mg	0,024464	poudre 500g	33059
tubes eppendorf 1.5ml	2	92	paquet de 500	23000
Microspin G-25	1colonne	4368,66	sachet de 50	218433
H20 pour PCR	59 μ l	1950,481	flacon 1L	33059
Total		177566,1		

Le tableau XX donne le coût des matériels et réactifs nécessaires pour la préparation d'une membrane 12x8 cm² de dot blot. La préparation d'une membrane 96 coûte **6323,649 FCFA**

Table XX : Préparation d'une membrane 12x8 cm²

Réactifs+consommables	Quantité requise	Coût en FCA pour qsp	Description	Prix unitaire en FCFA
0.1M EDTA	288µl=0,008g	0,528944	poudre 500g	33059
4M NaOH	288µl=0,046g	3,5972	poudre 500g	39100
2M Acétate Ammonium	96*4µl=0,0591g	7,52213	poudre 500g	63639
2XSSC	22280µl	97,00154	NaCl poudre 500g citrate 250g	4349.845
0.4M NaOH	200µl=0,08g	6,256	poudre 500g	39100
1MTris-Cl, 1.5M NaCl	200µl	5,448	Tris-500g, NaCl 500g	1L=27240
Tubes eppendorf 0.5ml	96	4608	sachet de 1000	48000
Membrane 96cm2	96cm2	1595,295	30cm*3m	149879
Total		6323,649		

Le tableau XXI donne le coût des consommables et réactifs nécessaires pour l'hybridation, lavage et révélation d'une membrane 12x8 cm² de dot blot soit **26100,48 FCFA**

Table XXI : Hybridation, le lavage et la révélation d'une membrane de dot blot

Réactifs+consommables	Quantité	Coût en FCA pour	Description	Prix unitaire en
-----------------------	----------	------------------	-------------	------------------

	requisite	qsp		FCFA
Hybridation solution	15ml	13545,9	solution de 100ml	90306
2XSSC	100ml	434,9845	NaClpoudre 500g	4349,845
			citrate 250g	
1XSSC+0,1% SDS	200ml	565,485	NaClpoudre 500g	2827,425
			citrate 250g,SDS 250g	
0,1M NaOH	200ml (0,02g)	1,564	poudre 500g	39100
Film radiographique Kodak	1	7234,9	paquet de 50 feuilles	361745
5XSSC	50ml		NaCl poudre 500g	10874,63
		543,7313	citrate 250g	
Kodak GBXDeveloper-	103ml		solution de 828ml	25447
Replenisher		3165,508		
Kodak GBXFixer-	103ml		solution de 3,8litres	22446
Replenisher		608,4047		
Total		26100,48		

Coût d'analyse pour un échantillon : cas de *pfcr*

Il faut

- 2 sondes (MNK,IET)
- 1 membrane de 96 (permet d'analyser 43 échantillons)
- 2 hybridations –lavages-revelation(HLR)

Le coût par échantillon revient à :

2x (coût d'une sonde) + coût d'une membrane + 2x (coût HLR)

$$(2 \times 177566,1) + 6323,649 + (2 \times 26100,48)$$

$$= \underline{\hspace{10em}} = 9620 \text{ FCFA}$$

43

Il faut 9620 FCFA pour le génotypage des 3 codons soit environ 3207 FCFA par codon sans le coût de la première amplification.

Une amplification coûte environ 1686,5 FCFA. Donc en total le coût revient à 11306,5 FCFA (4893,1 FCFA par codon).

Les sondes MNT et IEK ne seront pas utilisées pour les analyses de routine.

Le tableau XXII donne le coût de la double PCR suivie de la restriction enzymatique qui est de **3372,985 FCFA** par échantillon. Une seule amplification coûte environ 1686,5 FCFA.

Table XXII: Le coût de la PCR-RFLP

Désignation	Echantillons traités	Prix Unitaire	Prix/échantillon en FCFA
Micro-centrifuge tubes 0.5ml 1000 per box	466	48000	103,004
Flat Top Microcentrifuge tubes 1.5ml 500 per pack	3000	23000	7,667
Latex Exam Gloves Medium (Pack of 100)	700	3000	4,286
Barrier tips 0.1 - 10 µl pack of 1000	400	85000	212,500
Barrier tips 20 ul pack of 960	800	85000	106,250
Barrier tips 200 µul pack of 960	800	85000	106,250
Barrier tips 1000 µl pack of 768	5376	85000	15,811
Yellow 1 - 200 µl pack of 1000	467	15000	32,120
10X PCR Buffer 1.5ml	600	5000	8,333
50 mM chlorure de magnésium 1.5ml	1200	103429	86,191
100 mM dNTP's	2 000	1995000	997,500
Taq polymerase	215	250000	1162,791
100 pb DNA Ladder	3000	99000	33
10XTBE Buffer 4 l	4480	69000	15,402
agarose ultra pure GIBCOBRL	7000	388621	55,517
xylène cyanol 5 g powder	40000	72140	1,804
bleu de bromophenol sel de sodium 5 g	40000	34476	0,862
Ethidium bromure solution aqueuse a 1% pour l'électrophorèse 10 ml	56000	66336	1,185
Glycerol 99.5% de 500 ml	30000	80405	2,680
Primers	1	131,3	131,3
	2000	41359,5	20,680
Apo I 2000 unités			
BSA 10mg/ml 25mg	12500	6565	0,525
10xBuffer 3 6ml	3000	6565	2,188
électrophorèse après digestion			265,140
Total			3372,985

Le coût d'analyse d'un échantillon par la technique de dot blot est 3 fois plus cher que celui de la RFLP (tableau XXIII)

Table XXIII : Comparaison de coût du dot Blot à la PCR

Techniques	Coût par échantillon en FCFA
PCR-RFLP	3372,985 FCFA
Dot blot	11306,5 FCFA (4893,1 par codon)

V.3 - ESTIMATION DE LA DURÉE DE RÉALISATION

Table XXIV : Temps nécessaire pour PCR 1

étapes	temps
Dénaturation initiale	3 min
Dénaturation	30 secs
Hybridation	30 secs
Extension	1 mn
44 cycles	
Extension finale	3 mn
électrophorèse	30mn

Temps PCR1 = 3mn + 44x (30sec + 30sec + 1mn) + 3mn + 30mn = 122 mn.

Table XXV : Temps nécessaire pour PCR 2

étapes	Temps
Dénaturation initiale	5 mn
Dénaturation	30 secs
Hybridation	30 secs
Extension	1 mn
24 cycles	
Extension finale	3 mn
électrophorèse	30mn

Temps PCR 2 = 5mn + 24(30sec + 30sec + 1mn) + 3mn + 30mn = 86mn

Temps de digestion = 6 heures

Electrophorèse final=30mn

$$\begin{aligned}\text{Temps total PCR-RFLP} &= \text{temps PCR 1} + \text{temps PCR2} + \text{temps restriction} \\ &= 122\text{mn} + 86\text{mn} + 6 \times 60\text{mn} + 30 \\ &= 598 \text{ mn}\end{aligned}$$

Il faut environ dix (10) heures de temps pour avoir le résultat final de la PCR-RFLP.

Table XXVI: Estimation du temps de réalisation de dot blot : cas de *pfcr*

Etapes	Temps
Préparation de la membrane	1 heure
Marquage des sondes	45 minutes
Hybridation	6 heures pour chaque sonde soit 12 heures pour 2
Lavage	40 minutes par sonde soit 80 minutes pour 2 sondes
Exposition du film	12 – 24 heures par sonde soit 24 à 48 heures
Total	78,4 heures

Il faut théoriquement environ 39 à 63 heures pour le génotypage du gène *pfcr* par le dot blot. En pratique il faut 24 heures pour la détermination d'un haplotype. En d'autre terme 2 jours pour avoir le résultat final.

Table XXVII: la durée de réalisation de chacune des deux méthodes

Techniques	Durée en heures
------------	-----------------

PCR-RFLP	10
Dot blot	39-63

Le dot blot prend 4 à 6 fois plus de temps que la RFLP.

VI - DISCUSSION

Les analyses moléculaires ont été effectuées dans l'Unité d'Epidémiologie moléculaire et de la Chimiorésistance du Malaria Research and Training Center. Les échantillons provenaient de Pongonon. Cela se justifie par le fait qu'une équipe du MRTC travaille depuis quelques années sur ce site et en plus sur un protocole de recherche portant sur la chloroquine.

L'ADN extrait à partir du sang total a constitué notre matériel biologique. A cet effet le Nucleon kit (Kit Nucleon Bacc 2® Amersham International, Buckinghamshire, Royaume-Uni) a été utilisé.

Notre travail a porté d'une part sur la comparaison de deux techniques moléculaires utilisées dans le cadre de la surveillance de la chimiorésistance de *P.falciparum* et d'autre part sur la détermination des haplotypes du gène *pfcr* (74-76) rencontrés à Pongonon. Dans la méthodologie il s'agissait de comparer la PCR nichée suivie d'une restriction enzymatique ou polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) et la technique d'hybridation de sonde radiomarquée, le dot blot. Ces méthodes ont été décrites par différents groupes de chercheurs comme potentiels outils de surveillance de la résistance⁸¹, Error: Reference source not found.

La RFLP est la technique de routine que nous utilisons au laboratoire du MRTC pour le génotypage du gène *pfcr*. Nous l'avons utilisé comme la technique de référence.

La technique de dot blot qui constitue la technique à évaluer a été réalisée à partir des amplicons de la première amplification.

Huit sondes ont été utilisées pour l'hybridation moléculaire dont quatre avaient des contrôles positifs. Ces témoins ont servi pour l'évaluation de la spécificité des hybridations.

Le gène amplifié était le *pfcr* qui est utilisé comme un marqueur moléculaire de la résistance de *P.falciparum* à la chloroquine. Cela s'explique par le fait que la chloroquine a été utilisée récemment dans le protocole de recherche à Pongonon et que la détermination de la prévalence de *pfcr* faisait partie de nos objectifs.

Au total 192 échantillons ont été analysés avec succès par chacune des deux méthodes.

Les comparaisons ont porté sur la sensibilité, la spécificité, le coût et la durée de réalisation et la capacité de détection des souches minoritaires autrement dit des infections polyclonales.

Quand on considère les infections polyclonales comme mutants, globalement la prévalence de l'allèle mutant 76T de *Pfcr* à Pongonon était de 33,3 % par la PCR-RFLP

alors qu'elle était de 59,4 % par le dot blot. La différence était très significative ($p < 0,001$). Sabah Ahmed Omar et al. au Kenya ont fait des observations similaires⁸². Par contre Abdel Muhsin et al. ont trouvé que les deux méthodes étaient comparables Error: Reference source not found

Il est à noter que les proportions d'infections polyclonales étaient plus élevées avec le dot plus qu'avec la PCR_RFLP à Pongonon. La technique de dot blot montre que 52,6% des échantillons traités portent les deux génotypes (présence de l'allèle sauvage et de l'allèle mutant) contre 17,2% des cas de mixtes par la PCR-RFLP (tableau XVI). Cela pourrait s'expliquer par le fait que les souches minoritaires (< 20% de la population parasitaire) restent non détectables sur un gel par la PCR classique⁸³. Error: Reference source not found. Dans les infections polyclonales, les variants minoritaires peuvent être masqués par ceux majoritaires et la PCR est incapable de les détecter⁸⁴.

Sur huit des haplotypes recherchés seulement deux étaient présents dans les échantillons analysés. Il s'agissait de l'haplotype sauvage MNK de la souche 3D7 et l'haplotype mutant IET de la souche Dd2. Nos résultats vont dans le même sens que ceux observés par certains auteurs qui ont trouvé les allèles mutants CVIET (72-76) pour des parasites provenant de l'Afrique et l'Asie. L'haplotype SVMNT (72-76) de souche 7G8 de l'Amérique du Sud et la Papouasie-Nouvelle Guinée n'a pas rencontré dans notre étude. Cependant Sabah Ahmed Omar et al. au Kenya ont observé que la majorité des souches mutantes présentaient un polymorphisme MET (en position 74, 75, 76) Error: Reference source not found.

Quant à l'estimation du coût d'analyse de *pfcr* 74, 75, 76 d'un échantillon par le dot blot, il faut environ **11306,5 FCFA (4893,1 par codon)**. La PCR-RFLP coûte **3372,985 FCFA** pour l'analyse du codon K76T de *pfcr*. Même si le dot blot offre l'avantage d'analyser 3 codons ensemble il reste plus cher que la PCR (tableau XXIII).

En termes de temps pris pour l'analyse, le dot blot nécessite au minimum 2 jours par exemple pour le génotypage de *Pfcr* (MNK et IET) alors que les résultats de la PCR sont disponibles en 10 heures soit 4 à 6 fois moins de temps (Table XXVII).

La résistance aux antipaludiques n'est pas limitée à la chloroquine. Cette méthode peut être utilisée pour la détection des mutations ponctuelles des gènes codant la dihydrofolate Réductase (DHFR), la dihydroptéorate synthase (DHPS), le multidrug Resistance (MDR) ou le cytochrome B intervenant dans la résistance du parasite aux autres antipaludiques.

Les méthodes moléculaires facilitent grandement le diagnostic du paludisme pharmacorésistant. L'amplification génique est une méthode moléculaire qui peut être utilisée pour montrer qu'une pharmacorésistance s'est développée. L'utilisation d'isotopes dans la méthode d'hybridation dot blot, associée à l'amplification génique, accroît la sensibilité et la spécificité de la détection de la pharmacorésistance⁸⁵.

VII - CONCLUSION

En conclusion le dot blot est plus sensible que la RFLP-PCR et il est spécifique. Il offre l'avantage de déterminer les haplotypes. L'avantage de cette méthode est qu'elle permet d'analyser simultanément les taches produites par de nombreux échantillons. Un

autre avantage est que l'on peut retirer la sonde radioactive et en introduire une nouvelle pour détecter une autre mutation. On peut ainsi détecter successivement plusieurs mutations. Cette méthode permet de détecter, dans des échantillons dont nombre comportent des parasites à la fois résistants et sensibles, une population résistante minoritaire. Les résultats sont plus faciles à interpréter que ceux de la PCR par restriction enzymatique.

Cependant c'est une méthode qui demande beaucoup plus de temps et de réactifs. En termes de coût il est plus cher que la PCR-RFLP. C'est méthode robuste qui nécessite l'utilisation d'un produit radioactif.

Il ressort de ce travail que les haplotypes de PfcRT rencontrés au Mali sont le MNK pour les souches sauvages et le IET pour celles mutantes. La prévalence de PfcRT est élevée à Pongonon par la technique de dot blot.

VIII - RECOMMANDATIONS

Au terme de ce travail nous formulons les recommandations suivantes :

A l'agence malienne de radioprotection

- ✓ Equiper le laboratoire de dosimètre pour le renforcement des mesures de sécurité ;
- ✓ Faciliter l'importation des produits radioactifs pour des buts de recherche ;

Aux chercheurs

- ✓ Développer les ressources humaines dans l'amélioration de cette technique ;
- ✓ Utiliser cette méthode pour la surveillance de la chloroquinorésistance ;
- ✓ Envisager à substituer le produit radioactif par des fluorophores pour l'implémentation de la méthode ;
- ✓ Utiliser la RFLP PCR pour la PCR de routine à cause de son coût et de sa rapidité et de sa sécurité d'emploi ;
- ✓ Utiliser le dot blot pour des travaux spécialisés tels que la recherche des haplotypes, la détection de la réémergence de pfcr K76

IX - ABRÉVIATIONS

3	
32P
phosphore radioactif 32 sss
B	
BSA
Bovine Sérum Albumine iii
C	
CI50
concentration inhibitrice 50% pp
CMI
concentration minimale inhibitrice pp
CQ
Chloroquine s
D	
DHA
dihydroartémisinine ii
DHFR
Dihydrofolate reductase s
DHPS
Dihydropterate synthétase r
dNTP
deoxynucleotide triphosphate iii
E	
EDTA
acide éthylène-diamine-tétraacétique ppp
L	
LDH
lactate déshydrogénase qq
M	
MBq
mega becquerel vvv
MeV
mega electron volt ww
MRTC
Malaria Research and Training Center ddd
MS-PCR
Mutation Specific Polymerase Chain Reaction p
O	
OMS
Organisation Mondiale de la Santé n
Organisation Mondiale de la Santé n
P	
PABA
acide para-amino-benzoïque x
pb
paire base mmm
PBS
Phosphate Buffered Saline ggg
PCR
Polymerase Chain reaction p
Pfcr1
Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter kk
Pfmdr1
Plasmodium falciparum multidrug resistance 1 kk
Pfmdr2
Plasmodium falciparum multidrug resistance 2 kk
Pgh-1
P-glycoprotein homologue 1 oo
pLDH
Plasmodium lactate déshydrogénase qq

R	
RFLP.....p
Restriction Fragment Length Polymorphism.....p
RPMI.....pp
Roosevelt Park Memorial Institute.....pp
S	
SDS.....hhh
sodium dodecyl sulfate.....hhh
SERCA.....pp
Sarcoplasmic/ Endoplasmic Reticulum Ca (2+).....pp
SSC.....qqq
chlorure de sodium citrate de sodium.....qqq
T	
Taq.....rr
Thermus aquaticus.....rr
TE	
Tris-EDTA.....ggg

ANNEXES

Dot Blot MON N° 1	<i>Préparation 1M Tris-Cl, 1,5M NaCl (pH=8)= Solution de neutralisation</i>	<i>Original</i>
---------------------------------	--	-----------------

OBJET

Préparer la solution de neutralisation (1M Tris-Cl, 1,5M NaCl) pour la technique du DOT BLOT

DOMAINE D'APPLICATION

Pharmaciens ou médecins, techniciens de laboratoire, internes en Médecine ou en Pharmacie et biologistes, travaillant au sein du MEDRU.

DOCUMENTS DE REFERENCES

1-

HISTORIQUE

Version	Objet de la création	Date d'application
1.0	Création du document	08/06/06

APPROBATION

<i>Rédacteur :</i>		Signature	Date 08/06/06
Approbateur	Responsable du laboratoire	Signature	Date d'approbation 08/06/06

Sommaire:

- I- Principe
- II- Matériel et Réactifs
- III- Mesure de sécurité et Précautions
- IV- Technique
- V- Utilisations

I- Principe

Il s'agit de préparer 1l de Tris-Cl 1M+ NaCl 1,5M à partir de poudre de Tris (hydroxyméthyl) aminométhane et de chlorure de Sodium et d'ajuster le pH à 8 (HCl).

II -Matériel et réactifs

- 1- Tris (hydroxyméthyl) aminométhane ($(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$; $MW=121,14$; SIGMA 25,285-9 500g)
- 2- Chlorure de Sodium (NaCl ; $MW=58,44$. SIGMA S3014-500g)
- 3- Eau distillée déionisée
- 4- Balance et accessoires
- 5- Agitateur magnétique
- 6- Barreau magnétique
- 7- Erlenmeyer
- 8- Autoclave et bouteilles autoclavables
- 9- PH mètre et accessoires
- 10- Gants, Blouse

III- Mesure de Sécurité et Précautions

- 1- Porter des gants et une blouse pendant toute la durée de la procédure.
- 2- Nettoyer la paillasse (Ex : Ethanol).

IV- Technique

- 1- Dissoudre **121,14 g** de Tris **850 ml** d'eau
- 2- Ajouter **87,66g** de NaCl
- 3- Agiter vigoureusement à l'aide d'un agitateur magnétique
- 4- Ajuster le pH à 8,0 avec du HCl (HCl 4N= 42ml)
- 5- Ajuster le volume à 1l
- 6- Autoclaver et conserver à température ambiante.

V- Utilisations

La solution de neutralisation sera utilisée pour stopper la réaction de dénaturation de l'ADN fixée préalablement sur la membrane.

(MEDRU)



MODE OPERATOIRE NORMALISE

Dot Blot MON N° 2	Préparation 2 M Ammonium Acétate $(NH_4C_2H_3O_2)$, pH=7	<i>Original</i>
---------------------------------	--	-----------------

OBJET

Préparer le stock de travail d'Ammonium acétate pour la technique du DOT BLOT

I- Principe

Il s'agit de préparer 500 ml d'ammonium acétate à 2M à partir de poudre d'Ammonium Acétate.

II -Matériel et réactifs

- 1- Ammonium acétate ($NH_4C_2H_3O_2$; MW=77,08; SIGMA A-1542-250g)
- 2- Eau stérile (autoclavée)
- 3- Balance et accessoires
- 4- Agitateur magnétique
- 5- Barreau magnétique
- 6- Erlenmeyer
- 7- PH- mètre
- 8- Gants, Blouse

III- Mesure de Sécurité et Précautions

- 1- Porter des gants et une blouse pendant toute la durée de la procédure.
- 2- Nettoyer la paillasse (Ex : Ethanol).

IV- Technique

- 1- Dissoudre **77,08 g** d'ammonium acétate dans **400 ml** d'eau
- 2- Agiter vigoureusement à l'aide d'un agitateur magnétique
- 3- Ajuster le volume à 500 ml
- 4- Conserver à température ambiante.

V- Utilisation

La solution d'ammonium acétate 2M sera utilisée pour stopper la réaction de dénaturation de l'ADN.

Dot Blot	Préparation 250mM	
MON N° 3	Ethylendiaminetetraacétique (EDTA) pH=8	<i>Original</i>

OBJET

Préparer le stock de travail en EDTA pour la technique du DOT BLOT

I- Principe

Il s'agit de préparer 500ml d'EDTA à 250mM à partir de l'acide éthylène diaminotétraacétique sel disodique et d'ajuster le pH à 8 avec de l'hydroxyde de sodium.

II -Matériel et réactifs

- 1- Ethylendiaminetetraacetic acid disodium salt (*EDTA; C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈. 2H₂O ; MW=372.24; SIGMA E5134-500g*)
- 2- Hydroxide de Sodium (*NaOH; MW=40. SIGMA S8045-500g*)
- 3- Eau distillée déionisée
- 4- Balance et accessoires
- 5- Agitateur magnétique
- 6- Barreau magnétique
- 7- Erlenmeyer
- 8- Autoclave et bouteilles autoclavables
- 9- PH mètre et accessoires
- 10- Gants, Blouse

III- Mesure de Sécurité et Précautions

- 1- Porter des gants et une blouse pendant toute la durée de la procédure.
- 2- Nettoyer la pailleuse (Ex : Ethanol).

NB : L'hydroxyde de Sodium (NaOH ou encore appelé Soude caustique) est un produit corrosif.

IV- Technique

- 1- Dissoudre **46,53 g** d'EDTA disodique dans **350 ml** d'eau
- 2- Agiter vigoureusement à l'aide d'un agitateur magnétique
- 3- Ajuster le pH à 8,0 avec du NaOH
- 4- Ajuster le volume à 500 ml
- 5- Autoclaver et conserver à température ambiante.

Remarque: L'EDTA disodique n'est soluble que lorsque le pH de la solution est ajusté à 8.

V- Utilisations

La solution d'EDTA à 250mM sera utilisée :

- Pour arrêter la réaction de marquage de la sonde par le ^{32}P .
- Pour préparer la solution d'EDTA à 0,1M

Dot Blot MON N° 4	Préparation 0,1 M Hydroxyde de Sodium (NaOH)	<i>Original</i>
---------------------------------	---	-----------------

OBJET

Préparer le stock de travail en NaOH pour la technique du DOT BLOT

I- Principe

Il s'agit de préparer 1 litre de NaOH à 0,1M à partir d'une solution de NaOH à 4M.

II -Matériel et réactifs

- 1- Solution d'hydroxyde de Sodium à 4M
- 2- Eau distillée déionisée
- 3- Bouteilles autoclavables
- 4- Gants, Blouse

III- Mesure de Sécurité et Précautions

- 1- Porter des gants et une blouse pendant toute la durée de la procédure.
- 2- Nettoyer la paillasse (Ex : Ethanol).

NB : L'hydroxyde de Sodium est un produit corrosif.

IV- Technique

- 1- Prélever 25 ml d'une solution de NaOH à 4 M
- 2- Ajouter 975 ml d'eau
- 3- Agiter vigoureusement
- 4- Conserver à température ambiante.

V- Utilisation

La solution d'hydroxyde de sodium à 0,1M sera utilisée pour débarrasser la membrane des sondes radioactives.

Dot Blot MON N°5	Préparation 4 M Hydroxyde de Sodium (NaOH)	<i>Original</i>
--------------------------------	---	-----------------

OBJET

Préparer le stock de travail en NaOH pour la technique du DOT BLOT

I- Principe

Il s'agit de préparer 1 litre de NaOH à 4M à partir de granulés d'hydroxyde de sodium.

II -Matériel et réactifs

- 1- Hydroxide de Sodium (*NaOH; MW=40. SIGMA S8045-500g*)
- 2- Eau distillée déionisée
- 3- Balance et accessoires
- 4- Agitateur magnétique
- 5- Barreau magnétique
- 6- Erlenmeyer
- 7- Gants, Blouse

III- Mesure de Sécurité et Précautions

- 1- Porter des gants et une blouse pendant toute la durée de la procédure.
- 2- Nettoyer la paillasse (Ex : Ethanol).

NB : L'hydroxyde de Sodium est un produit corrosif.

IV- Technique

Dissoudre **40 g** d'Hydroxyde de sodium dans **900 ml** d'eau

- 1- Agiter vigoureusement à l'aide d'un agitateur magnétique
- 2- Ajuster le volume à 1l
- 3- Conserver à température ambiante.

V- Utilisation

La solution d'hydroxyde de sodium à 4M sera utilisée :

- Pour la dénaturation de l'ADN
- Pour préparer les solutions de NaOH à 0,4M et 0,1M

Dot Blot	Préparation de la solution d'hybridation	<i>Original</i>
MON N°6		
Nombre de page : 1		

OBJET

Préparer la solution d'hybridation pour la technique du DOT BLOT

I- Principe

Il s'agit de préparer 100ml de la solution d'hybridation à partir de la solution de pré hybridation de SIGMA.

II -Matériel et réactifs

- 1- 20X SSPE
- 2- 50X Denhardt's reagent
- 3- 20mg/ml Salmon sperm
- 4- 10% SDS
- 5- Eau stérile (eau autoclavée)
- 6- Gants, Blouse

Réactifs	Volume à prélever	Concentration finale
20X SSPE	25 ml	5X
50 X Denhardt's reagent	10 ml	5X
10% SDS	5 ml	0,5%
20mg/ml Salmon Sperm	0,1 ml	0,2mg
Eau stérile	59,9 ml	
TOTAL	100 ml	

III- Mesure de Sécurité et Précautions

- 1- Porter des gants et une blouse pendant toute la durée de la procédure.
- 2- Nettoyer la paillasse (Ex : Ethanol).

IV- Technique

Ajouter 25ml de SSPE 20X à 59,9 ml d'eau stérile

- 1- Ajouter 10 ml de Denhardt's reagent 50X
- 2- Ajouter 5ml SDS 10%
- 3- Ajouter 0,1 ml de Salmon Sperm 20mg/ml
- 4- Mélanger vigoureusement
- 5- Conserver à 4°C

V- Utilisation

La solution d'hybridation est utilisée lors du processus d'hybridation de la sonde radiomarquée aux brins d'ADN dénaturé.

Dot Blot MON N°7	<i>Préparation 2X SSC pH=7</i>	<i>Original</i>
----------------------------	---------------------------------------	-----------------

OBJET

Préparer le stock de travail en SSC pour la technique du DOT BLOT

I- Principe

Il s'agit de préparer 1 litre de SSC 2X à partir d'une solution autoclavée de SSC 20X de pH=7.

II -Matériel et réactifs

- 1- 20X SSC autoclavée
- 2- Eau stérile (autoclavée)
- 3- Mesurette
- 4- Erlenmeyer
- 5- Gants, Blouse

III- Mesure de Sécurité et Précautions

- 1- Porter des gants et une blouse pendant toute la durée de la procédure.
- 2- Nettoyer la paillasse (Ex : Ethanol).

IV- Technique

- 1- Prélever **100 ml** de SSC 20X
- 2- Ajouter **900 ml** d'eau stérile
- 3- Conserver à température ambiante.

V- Utilisation

La solution de SSC 2X sera utilisée comme première solution de lavage de la membrane avant l'exposition de cette dernière à film.

Dot Blot	Préparation 20X SSC pH=7	<i>Original</i>
MON N° 8		

OBJET

Préparer le stock de travail en SSC pour la technique du DOT BLOT

I- Principe

Il s'agit de préparer 1 litre de SSC 20X à partir de cristaux de chlorure de sodium et de sodium citrate, puis d'ajuster le pH à 7 avec de l'acide chlorhydrique.

II -Matériel et réactifs

- 1- Chlorure de Sodium (*NaCl*; *MW=58,44. SIGMA S3014-500g*)
- 2- Sodium citrate (*C₆H₅O₇Na₃.H₂O, MW=294,1; SIGMA C3434-250g*)
- 3- Acide Chlorhydrique
- 4- Eau distillée déionisée
- 5- Balance et accessoires
- 6- Agitateur magnétique
- 7- PH mètre et accessoires
- 8- Barreau magnétique
- 9- Bouteilles autoclavables
- 10- Autoclave
- 11- Erlenmeyer
- 12- Gants, Blouse

III- Mesure de Sécurité et Précautions

- 1- Porter des gants et une blouse pendant toute la durée de la procédure.
- 2- Nettoyer la paillasse (Ex : Ethanol).

NB : L'acide chlorhydrique est un produit corrosif.

IV- Technique

- 1- Dissoudre **175,3g** de NaCl dans **800 ml** d'eau
- 2- Ajouter **88,2g** de Sodium citrate.2H₂O
- 3- Ajuster le pH à 7 avec du HCl
- 4- Ajuster le volume à 1l
- 5- Faire des aliquots
- 6- Autoclaver et conserver à température ambiante.

V- Utilisation

La solution de SSC 20X sera utilisée :

- Pour préparer les solutions 2X SSC et 5X SSC
- Pour préparer la deuxième solution de lavage (1XSSC + 0,1% DSD)

Dot Blot MON N°9	Préparation 20X Saline Sodium Phosphate EDTA (SSPE) SIGMA	<i>Original</i>
--------------------------------	--	-----------------

OBJET

Préparer le stock de travail en SSPE pour la technique du DOT BLOT

I- Principe

Il s'agit de préparer 1 litre de SSPE 20X à partir de SSPE sous forme de poudre (SIGMA)

II -Matériel et réactifs

- 1- SSPE (**SIGMA S8140**)
- 2- Eau stérile (eau autoclavée)
- 3- Mesurette
- 4- Erlenmeyer
- 5- Gants, Blouse

III- Mesure de Sécurité et Précautions

- 1- Porter des gants et une blouse pendant toute la durée de la procédure.
- 2- Nettoyer la paillasse (Ex : Ethanol).

IV- Technique

- 1- Dissoudre le contenu du flacon de SSPE de SIGMA dans 1000 ml d'eau stérile
- 2- Conserver à température ambiante.

V- Utilisation

La solution de SSPE 20X sera utilisée pour préparer la solution d'hybridation.

Dot Blot MON N°10	Préparation 1X SSC + 0,1% SDS	<i>Original</i>
-----------------------------	--------------------------------------	-----------------

OBJET

Préparer la deuxième solution de lavage 1XSSC+ 0,1% SDS pour la technique du DOT BLOT

I- Principe

Il s'agit de préparer 1 litre d'une solution de 1X SSC + 0,1%SDS à partir d'une solution autoclavée de SSC 20X de pH=7 et de SDS 10%.

II -Matériel et réactifs

- 1- 20X SSC autoclavée
- 2- 10% SDS
- 3- Eau stérile (autoclavée)
- 4- Mesurette
- 5- Erlenmeyer
- 6- Gants, Blouse

III- Mesure de Sécurité et Précautions

- 1- Porter des gants et une blouse pendant toute la durée de la procédure.
- 2- Nettoyer la paillasse (Ex : Ethanol).

IV- Technique

- 1- Prélever **50 ml** de SSC 20X
- 2- Ajouter **940 ml** d'eau stérile
- 3- Ajouter **10ml** de SDS 10%
- 4- Conserver à température ambiante.

Rq : Ne jamais mélanger directement le SDS et le SSC ; Toujours diluer l'une des solutions avant d'ajouter la seconde.

V- Utilisation

La solution de 1X SSC + 0,1%SDS sera utilisée comme deuxième solution de lavage de la membrane avant exposition de cette dernière au film.

Dot Blot	Préparation 50X Denhardt's reagent (BDH laboratory supply)	<i>Original</i>
MON N° 11		

OBJET

Préparer le stock de travail en denhardt's reagent 50X pour la technique du DOT BLOT

I- Principe

Il s'agit de préparer 1 litre de SSPE 20X à partir de SSPE sous forme de poudre (SIGMA)

II -Matériel et réactifs

- 1- Denhardt's reagent (***BDH laboratory supply***)
- 2- Eau stérile (eau autoclavée)
- 3- Mesurette
- 4- Erlenmeyer
- 5- Gants, Blouse

III- Mesure de Sécurité et Précautions

- 1- Porter des gants et une blouse pendant toute la durée de la procédure.
- 2- Nettoyer la paillasse (Ex : Ethanol).

IV- Technique

- 1- Dissoudre le contenu du flacon de Denhardt's reagent d'**AMERSCO** dans **X** ml d'eau stérile
- 2- Conserver à température ambiante.

V- Utilisation

La solution de Denhardt's **50X** sera utilisée pour préparer la solution d'hybridation. Ce réactif bloque la réaction d'hybridation et prévient ainsi la fixation des sondes sur les espaces vides de la membrane et les ADN non spécifiques.

Dot Blot MON N° 12 Nombre de page : 1	Préparation 0,4 M Hydroxyde de Sodium (NaOH)	<i>Original</i>
--	---	-----------------

OBJET

Préparer le stock de travail en NaOH pour la technique du DOT BLOT

I- Principe

Il s'agit de préparer 1 litre de NaOH à 0,4M à partir d'une solution de NaOH à 4M.

II -Matériel et réactifs

- 1- Solution d'hydroxyde de Sodium à 4M
- 2- Eau distillée déionisée
- 3- Bouteilles autoclavables
- 4- Gants, Blouse

III- Mesure de Sécurité et Précautions

- 1- Porter des gants et une blouse pendant toute la durée de la procédure.
- 2- Nettoyer la paillasse (Ex : Ethanol).

NB : L'hydroxyde de Sodium est un produit corrosif.

IV- Technique

- 1- Prélever 100 ml d'une solution de NaOH à 4 M
- 2- Ajouter 900 ml d'eau
- 3- Agiter vigoureusement
- 4- Conserver à température ambiante.

V- Utilisation

La solution d'hydroxyde de sodium à 0,4M sera utilisée pour assurer la dénaturation complète de l'ADN fixée sur la membrane.

Dot Blot MON N° 13 Nombre de page : 2	Préparation 10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) pH=7,2	<i>Original</i>
--	--	-----------------

OBJET

Préparer le stock de travail en SDS pour la technique du DOT BLOT

I- Principe

Il s'agit de préparer 1 litre de SDS à 10% à partir de cristaux de SDS, et ajuster le pH à 7,2 avec de l'acide chlorhydrique.

II -Matériel et réactifs

- 1- Sodium Dodecyl Sulfate (SDS, $C_{12}H_{25}O_4S$; MW=288,38; SIGMA L4390-250g)
- 2- Acide Chlorhydrique
- 3- Eau distillée déionisée
- 4- Balance et accessoires
- 5- Agitateur magnétique
- 6- PH mètre et accessoires
- 7- Barreau magnétique
- 8- Bain-marie 68°C
- 9- Erlenmeyer
- 10- Gants, blouse, bavette

III- Mesure de Sécurité et Précautions

- 1- Porter des gants et une blouse pendant toute la durée de la procédure.
- 2- Utiliser la bavette lors de la pesée des cristaux de SDS
- 3- Nettoyer la paillasse (Ex : Ethanol).

NB : L'acide chlorhydrique est un produit corrosif.

IV- Technique

- 1- Dissoudre **100 g** de cristaux de SDS dans **900 ml** d'eau
- 2- Chauffer à 68°C pour dissoudre les cristaux
- 3- Ajuster le pH à 7,2 avec du HCl
- 4- Ajuster le volume à 1l
- 5- Faire des aliquots et conserver à température ambiante.

Notes :

- Les cristaux de SDS se dispersent très facilement, porter un masque lors de la pesée et nettoyer la paillasse ainsi que tout le matériel utilisé pour la pesée après usage.

- Lorsque qu'il commence a se former des cristaux de SDS (due à la fraîcheur), chauffer la solution à 37°C pour re-dissoudre les cristaux.

V- Utilisation

La solution de SDS à 10% sera utilisée :

- Pour préparer l solution d'hybridation
- Pour préparer la deuxième solution de lavage (1XSSC + 0,1% SDS)

DOT BLOT RECORD SHEET

Date of blot
 Blot ID code **BLOT 13**
 Made by

Locus eg DHFR/ DHPS/ PFCRT...
 Surface area of blot (cm²) **96 cm²**

DNA LOADING

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

RESULTS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

NOTES

FICHE DE SUIVI DES DECHETS RADIOACTIFS

Nom du gène

Date de marquage

Volume (μ l)

Activité (MBq)

Localisation de l'isotope:

DATE	VOLUME ENLEVEE (μ l)	QTE ENLEVEE (MBq)	VOLUME RESTANTE (μ l)	QTE RESTANTE (MBq)

REMARQUES

FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom : DARA

Prénom : Antoine

Nationalité : MALIENNE

Thèse : Comparaison de deux techniques moléculaires de surveillance de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum*

Date de soutenance : 12/01/2009

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la FMPOS de l'Université de Bamako, Mali

Résumé

Nous avons effectué une étude comparative de deux techniques moléculaires de surveillance de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum*. La PCR nichée suivie de restriction enzymatique a été comparée à une technique d'hybridation moléculaire, le dot blot. Notre gène d'intérêt était le *pfcr*, un marqueur moléculaire utilisé pour le génotypage des souches de *Plasmodium falciparum* chloroquinorésistantes. Les comparaisons ont porté sur la sensibilité, la spécificité, le coût et la durée de réalisation et la capacité de détection des souches minoritaires autrement dit des infections polyclonales. Nous avons également recherché des haplotypes de *pfcr* (74-76). Le travail a porté sur un total de 192 échantillons.

Nous avons trouvé que la fréquence de l'allèle mutant 76T de *pfcr* à Pongonon était de 33,3 % par la PCR alors qu'elle était de 59,4 % par le dot blot. La différence entre les deux méthodes était statistiquement significative ($p < 0,001$).

La technique de dot blot a montré une proportion d'infections mixtes de 52,6% contre 17,2% pour la PCR-RFLP. Sur un ensemble de huit haplotypes recherchés deux seulement (MNK et IET) étaient présents.

Le coût de génotypage d'un échantillon par le dot blot a été estimé à 11306,5 FCA contre 3372,985 FCFA pour la PCR-RFLP. En ce qui concerne la durée de réalisation le dot blot nécessite 4 à 6 fois plus de temps que la PCR. En conclusion, nous pouvons dire que la technique de dot blot est plus sensible que la PCR-RFLP. Cependant c'est une méthode laborieuse et lourde qui ne peut être utilisée que pour des travaux spécialisés de recherche.

Mots clés : *Plasmodium falciparum*, chimiorésistance, *pfcr*, dot blot, PCR-RFLP.

Topic: Comparison of two molecular genotyping methods for drug-resistant *Plasmodium falciparum* monitoring

Abstract

We carried out a comparison on two molecular methods of *Plasmodium falciparum* drug resistance monitoring. The nested PCR followed by enzyme restriction was compared to the dot blot hybridization technique. We amplified the *pfcr*t gene. Pfcrt is a molecular marker used for genotyping of chloroquine resistant strains of *Plasmodium falciparum*. Comparisons have focused on the sensitivity, specificity, cost and time of each assay and their ability to detect minority strains in polyclonal infections. We also looked for pfcrt haplotype at position (74-76). The work covered a total of 192 samples.

We found that the frequency of the mutant allele 76T of pfcrt in Pongonon was 33.3% by PCR compared to 59.4% by dot blot. The difference between the two methods was statistically significant ($p < 0.001$).

The technique of dot blot showed a proportion of mixed infections of 52.6% against 17.2% for PCR-RFLP. On a set of eight haplotypes investigated only two haplotypes (MNK and IET) were present.

The cost of genotyping of a sample by the dot blot was estimated at 11306.5 FCA against 3372.985 FCFA for PCR-RFLP. The dot blot hybridization requires 4 to 6 more time than the PCR. In conclusion, we found that the dot blot technique is specific and more sensitive than PCR-RFLP. However it is a laborious and cumbersome procedure that can be used for only specialized research .

Key words: *Plasmodium falciparum*, drug resistance, *pfcr*t, dot blot, PCR-RFLP

SERMENT DE GALIEN

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

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

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

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

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

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

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

Je le jure !

X-RÉFÉRENCES:

1

Grover-Kopec E, Kawano M, Klaver RW, Blumenthal B, Ceccato P, Connor SJ. All online porational rainfall-monitoring resource for epidemic malaria earlywarning systems in Africa. *Malar J*. 2005 Jan 21;4(1):6.

2 Kenya. Ministry of Health. Malaria Control Programme. Epidemiologie of malaria in Kenya. *Afr J Med Pract*. 1994 Mar-Apr;1(1):5-

3 World malaria situation in 1994. Part III. *Wkly Epidemiol Rec*. 1997 Sep 19;72(38):285-90.

4 OMS: Stratégie mondiale de lutte antipaludique Genève 1992

5 EDINGTON GM, LAIN WN. Relationship between haemaglobin C and Malaria in Ghana. *B Med J* 1967

6 OMS. Mise en œuvre de la stratégie mondiale de lutte antipaludique. Rapport d'un groupe d'étude de l'OMS sur la mise en œuvre du plan mondial d'action pour la lutte contre le paludisme, 1993-2000. Série de rapports techniques 1993, n°839, 67p.

7 OMS. African initiative for malaria control in the 21st century. WHO 1998, 18p.

8 OMS. Rollback Malaria Project : resources support network for prevention and control of malaria. *Epidemics.doc* OMS 1998, n° CDS/RBM/RSN/EPI/98.

9 Mylène Weill et al., 2003, Résistance des moustiques aux insecticides: une même mutation commune à différentes espèces.

10 Gbary AR, Guiguemde TR, Ouedraogo JB. [Emergence of chloroquine-resistant malaria in West Africa: the case of Sokode (Togo)], *Trop Med Parasitol*. 1988 Jun;39(2):142-4.

11 PETERS W, RICHARDS WH. Antimalarial Drugs. *Handb.Exp.Pharm*, 68/II, p.3-60, Springer verlag, Publ. 1984.

12 KAIN K., et al. In vivo response of *Plasmodium falciparum* malaria to chloroquine in northern thailand ; *J. Inf. Dis*. 170 1994

13 CAMPBELL CC, CHIN W, COLLINS WE, et al. Chloroquine resistant *P. falciparum* from East Africa cultivation and drug sensitivity of the Tanzanian I/CDC strain from an American tourist. *Lancet* 1979 ;ii :11551-4.

14 KHAN AA, MAGHIRE MT. Relative chloroquine resistance of *P. falciparum* in Zambia. *Brit Med J* 1978 ;1 :1669-72.

15 CAMARA F. Evolution de la chimiorésistance des souches maliennes de *P. falciparum* aux amino-4-quinoléines de 1985 à 1991. Thèse Médecine, ENMP, 1991.N°4

16 Trape JF. The public health impact of chloroquine resistance in Africa. *Am J Trop Med Hyg* 2001;64:12-7.

17 **Peterson DS, Walliker D, Wellems TE**. Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in *falciparum* malaria. ***Proc Natl Acad Sci U S A***. 1988 Dec;85(23):9114-8

18 **Reed MB, Saliba KJ, Caruana SR, Kirk K, Cowman AF**. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. ***Nature***. 2000 Feb 24;403(6772):906-9.

19 Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, Ursos LM, Sidhu AB, Naude B, Deitsch KW, Su XZ, Wootton JC, Roepe PD, Wellems TE. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell*. 2000 Oct;6(4):861-71.

20 Shaio MF, Wang P, Lee C-S, Sims PFG, Hyde JE, 1998. Development and comparison of quantitative assays for the dihydropteroate synthase codon 540 mutation associated with sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*116: 203-210.

- 21 Abdel-Muhsin, A.-M. A., Ranford-Cartwright, L. C., Medani, A.-R., Ahmed, S., Suleiman, S., Khan, B., Hunt, I., Walliker, D. & Babiker, H. A. Detection of mutations in the Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase (dhfr) gene by dot-blot hybridization. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 2002; 67,24-27.
- 22 Akintonwa A, Gbajumo SA, Mabadeje AF. Placental and milk transfer of chloroquine in human. Ther Drug Monit. 1988;10(2):147-149.
- 23 MACAIGNE. F, COMBE. A, VINCEDEAU. P, EBOUMBOU. J, GARNIER. T, MICHEL. R, RIPERT. C. Sensibilité in vivo de Plasmodium falciparum à l'amodiaquine dans la ville d'Edéa (Cameroun). Bull. Soc. Path. Exot. 1989;82:208-216
- 24 Neftel, K. A., Woodtly, W., Schmid, M., Frick, P. G. and Fehr, J.: Amodiaquine induced agranulocytosis and liver damage. Br. Med. J. 292: 721-723, 1986.
- 25 Hatton, C. S. R., Peto, T. E. A., Bunch, C. and Pasvol, G.: Frequency of severe neutropenia associated with amodiaquine prophylaxis against malaria. Lancet 1: 411-413, 1986
- 26 Larrey, D., Castot, A., Pessayre, D., Merigot, P., Machayekhy, J. P., Feldamn, G., Lenoir, A., Ruelt, B. and Benhamov, J. P.: Amodiaquine-induced hepatitis. Ann. Intern. Med. 104: 801-803, 1986.
- 27 A. Jaeger, et al., Clinical features and management of poisoning due to antimalarial drugs. Med toxicol 1987; 2: 242-273.
- 28 D. Schellenberg, E. Kahigwa, C. Drakeley, et al. The safety and efficacy of sulfadoxine/pyriméthamine, amodiaquine, and their combination in the treatment of uncomplicated P. falciparum malaria. Am J Trop Med Hyg 2002;67(1): 17-23.
- 29 Zongo I, Dorsey G, Rouamba N, Tinto H, Dokomajilar C, Guiguemde RT, Rosenthal PJ, Ouedraogo JB. Artemether-lumefantrine versus amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine for uncomplicated falciparum malaria in Burkina Faso: a randomised non-inferiority trial. Lancet. 2007 Feb 10;369(9560):491-8. Erratum in: Lancet. 2007 Mar 10;369(9564):826.
- 30 Malvy D., Djossou F., Receveur M.C., Le Bras M. Plasmodies, traitement, prévention. Encyclopédie Medico-chirurgicale 8-507-A-25.
- 31 S.Krishna, NJ White. Pharmacokinetics of quinine, chloroquine and amodiaquine. Clinical complications. Clin pharmacokinet 1996 ; 31: 263-299.
- 32 Thera MA, Keita F, Sissoko MS, Traoré OB, Coulibaly D, Sacko M, Lameyre V, Ducret JP, Doumbo O. Acceptability and efficacy of intra-rectal quinine alkaloids as a pre-transfer treatment of non-per os malaria in peripheral health care facilities in Mopti, Mali. Malar J. 2007 May 22;6:68.
- 33 Nosten F, White NJ. Artemisinin-based combination treatment of falciparum malaria. Am J Trop Med Hyg. 2007 Dec;77(6 Suppl):181-92.
- 34 Maeno et al. Morphologic Effects of Artemisinin in Plasmodium Falciparum. Am J Trop Med Hyg.1993; 49: 485-491
- 35 Organisation mondiale de la santé. Chimiothérapie du paludisme et résistance aux antipaludiques. Série de Rapports techniques, n° 529, Genève : Organisation mondiale de la santé, 1973 ; 128 p.
- 36 SPRATT BG. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. Sciences 1994;264:388-393.
- 37 NIKAIIDO H et al. Prevention of drug access to bacterial target: permeability barriers and active efflux. Sciences 1994;264:382-388.
- 38 WHO/ CDS/ RBM/ 2001.35. Les combinaisons thérapeutiques antipaludiques. Rapport d'une consultation technique de l'OMS. 4-5 avril 2001.
- 39 Touray MG, Warburg A, Laughinghouse A, Krettli AU, Miller LH. Developmentally regulated infectivity of malaria sporozoites for mosquito salivary glands and the vertebrate host. J Exp Med 1992; 176:1607-12.

40 BASCO LK, LE BRAS J, RHODES Z & WILSON MC. Analysis of Pfm^{dr}1 and drug susceptibility in fresh isolates of *Plasmodium falciparum* from Sub-Saharan Africa. *Mol Biochem Parasitol*, 1995;74:157-166.

41 COWMAN AF, KARCZ SR. The pfm^{dr} gene homologues of *Plasmodium falciparum*. *Acta leiden* 1991;60(1):121-9.

42 BRAY PG, & WARD SA. A comparison of phenomenology and genetic of multidrug resistance in cancer cells and quinoline resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol Ther*.1998;77:1-28.

43 HENK B, HENDRIK W, VAN V, BERT P, ARNOLD JM, DRIESSEN W, N. K. Mecanism of MDR transporters; *FEMS Microbiology Reviews* 1997;21:55-84.

44 DURAISINGH MT, DRAKRLEY CJ, MULLER O, BAYLEY R, SNOUNOU G et al. Evidence for selection for the tyrosine-86 allele of the Pfm^{dr}1 gene of *Plasmodium falciparum* by chloroquine and amodiaquine. *Parasitology*, 1997;177:1429-1433.

45 Djimde A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourte Y, Dicko A, Su XZ, Nomura T, Fidock DA, Wellems TE, Plowe CV, Coulibaly D. A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *N Engl J. Med* 2001 Jan 25;344(4):257-63.

46

Viswanathan Lakshmanan, Patrick G Bray, Dominik Verdier-Pinard, David J Johnson, Paul Horrocks, Rebecca A Muhle, George E Alakpa, Ruth H Hughes, Steve A Ward, Donald J Krogstad, Amar Bir Singh Sidhu, and David A Fidock. A critical role for PfcRT K76T in *Plasmodium falciparum* verapamil-reversible chloroquine resistance. *EMBO J*. 2005 July 6; 24(13): 2294-2305

47 Olliaro, P. Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. *Pharmacol Ther* 2001; 89(2): 207-19.

48 Plowe, C. V. Monitoring antimalarial drug resistance: making the most of the tools at hand. *J Exp Biol* 2003; 206(Pt 21): 3745-52.

49 Durrand, V., A. Berry, et al. Variations in the sequence and expression of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (Pfcrt) and their relationship to chloroquine resistance in vitro. *Mol Biochem Parasitol* 2004; 136(2): 273-85.

50 Wellems, T. E. and C. V. Plowe . Chloroquine-resistant malaria. *J Infect Dis* 2001;184(6): 770-6.

51 White, N. J. Antimalarial drug resistance. *J Clin Invest* 2004;113(8): 1084-92.

52 Watkins WM, Sixsmith DG, Spencer HC, Boriga DA, Kariuki DM, Kipingor T, Koech DK, 1984. Effectiveness of amodiaquine as treatment for chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* infections in Kenya. *Lancet* 1: 357-359

53 Gorissen E, Ashruf G, Lamboo M, Bennebroek J, Gikunda S, Mbaruku G, Kager PA, 2000. In vivo efficacy study of amodiaquine and sulfadoxine/pyrimethamine in Kibwezi, Kenya and Kigoma, Tanzania. *Trop Med Int Health* 5: 459-463

54 Adjuik M, Agnamey P, Babiker A, Borrmann S, Brasseur P, Cisse M, Cobelens F, Diallo S, Faucher JF, Garner P, Gikunda S, Kreamsner PG, Krishna S, Lell B, Loolpapit M, Matsiegui PB, Missinou MA, Mwanza J, Ntoumi F, Olliaro P, Osimbo P, Rezbach P, Some E, Taylor WR, 2002. Amodiaquine-artesunate versus amodiaquine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in African children: a randomised, multicentre trial. *Lancet* 359: 1365-1372

55 MARTHA LEMNGE*, MICHAEL ALIFRANGIS, MWANAIDI Y. KAFUYE, METHOD D. SEGEJA, SAMWEL GESASE, DANIEL MINJA, JULIUS J. MASSAGA, ANITA M. RØNN, AND IB C. BYGBJERG High reinfection rate and treatment failures in children treated with amodiaquine for *falciparum* malaria in muheza villages, northeastern Tanzania . *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 75(2), 2006, pp. 188-193

56 Olliaro, P., C. Nevill, J. LeBras, P. Ringwald, P. Mussano, P. Garner, and P. Brasseur. 1996. Systematic review of amodiaquine treatment in uncomplicated malaria. *Lancet* 348:1196-1201

57 Ochong EO, van den Broek IV, Keus K, Nzila A. Short report: association between chloroquine and amodiaquine resistance and allelic variation in the *Plasmodium falciparum* multiple drug resistance 1 gene and the chloroquine resistance transporter gene in isolates from the upper Nile in southern Sudan. *Am J Trop Med Hyg.* 2003 Aug; 69(2):184-7.

58 WANG P, READ M, SIMS P.E, HYDE J.E. Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutation dihydrofolate synthetase and an additional factor associated with folate utilization. *Mol. Microbiol.* 1997 Mar;23(5):979-86.

59 HYDES J.E. The dihydrofolate reductase-thymidilate synthetase gene in the drug resistance of malaria parasites. *Pharma. Ther* 1990;48:45-49.

60 BZIK DJ, LIW B, HRIIT, INSELBURG J. Molecular cloning and sequence analysis of *P. falciparum* dihydrofolate reductase-thymidilate synthetase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987;84:8360-8364.

61 ZOLG JW, PLITT JR, CHEN GX, PALMERS S. Mutation point in the dihydrofolate reductase-thymidilate synthetase gene as the molecular basis for pyrimethamine resistance for *P. falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1989;36:253-262.

62 CORTESE JF, PLOWE CV. Antifolate resistance due to new and known *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase mutants expressed in yeast. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1998;94:205-214.

63

DIOURTE Y, DJIMDE A, DOUMBO OK, SAGARA I, COULIBALY Y, DICKO A, DIALLO M, DIAKITE M, CORTESE JF, PLOWE CV. Pyrimethamine-sulfadoxine efficacy and selection for mutation in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate and dihydropteorate synthetase in Mali. *Am J Trop Med Hyg.* 1999 Mar;60(3): 475-8.

64 Kublin JG, Dzinjalama FK, Kamwendo DD, Malkin EM, Cortese JF, Martino LM, Mukadam RA, Rogerson SJ, Lescano AG, Molyneux ME, Winstanley PA, Chimpeni P, Taylor TE, Plowe CV. Molecular markers for failure of sulfadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil-dapsone treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis.* 2002 Feb 1;185(3):380-8. Epub 2002 Jan 17.

65 GYANG FN, PETERSON DS, WELLEMS TE. *P. falciparum* rapid detection of dihydrofolate reductase mutations that confer resistance to cycloguanil and pyrimethamine. *Exp. Parasitol.* 1992;74:470-472.

66 PETERSON DS, DI SANTI SM, PAVOA M, CALVOSA VS, DO ROSARIO VE, WELLEMS TE. Prévalence of dihydrofolate Ans-108 mutations as the basis for pyrimethamine resistance of *P. falciparum* malaria in the brasalian amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1991;45(4):492-497.

67 Faucher JF. Associations thérapeutiques et nouveaux antipaludiques en réponse à la chimio résistance de *P.falciparum*. Travaux cliniques et parasitologiques au Gabon et au Sénégal et revue de la littérature. Thèse de doctorat en science de la vie et de la santé, université de Franche-Comte. Faculté de Médecine et de Pharmacie de Besançon, 02 sept 2005.

68 BASCO, L.K. and LE BRAS, J. (1993). In vitro activity of artemisinin derivatives against African isolates and clones of *Plasmodium falciparum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 49: 301-307.

69 WONGSRICHANALAI, C., NGUYEN, T.D., TRIEU, N.T. et al. (1997). In vitro susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates in Vietnam to artemisinin derivatives and other antimalarials. *Acta Tropica*, 63: 151-158

70 INSELBERG, J. (1985). Induction and isolation of artemisinin-resistant mutants of *Plasmodium falciparum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 34: 417-418.

71 PETERS, W., ROBINSON, B.L., ROSSIER, J.C. et al. (1993). The chemotherapy of rodent malaria. XLIX. The activities of some synthetic 1,2,4-trioxanes against chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant parasites. Part 2: Structure activity studies on cis-fused cyclopenteno-1,2,4-trioxanes (fenzans) against drug-sensitive and drug-resistant lines of *Plasmodium berghei* and *P. yoelii* ssp. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 87: 9-16.

72 Jambou R, Legrand E, Niang M, Khim N, Lim P, Volney B, Ekala MT, Bouchier C, Esterre P, Fandeur T, Mercereau-Puijalon O. Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6.

Lancet. 2005 Dec 3;366(9501):1960-3.

73 Payne D. Aspects pratiques de l'utilisation des systèmes standard OMS d'épreuve in vitro macro et micro-test de l'OMS pour la détermination de la sensibilité de Plasmodium falciparum à la chloroquine, la méfloquine, l'amodiaquine et la quinine. WHO/MAL 1984;84:2-21.

74 Le Bras J, Deloron P. in vivo sensitivity of P. falciparum: evaluation of a new semi-micro-test. Am. J. Trop. Med. Hyg 1983;32:447-53.

75 DESJARDIN RE, CANFIELDS CJ, HAYNES JP, CHNULAY JD. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by semi-automated micro technique. Antimicrob. Agent Chemother 1979;16:710-8.

76 Le Bras J, Andrieux B, Hatin I, Savel J, Coulaud JP. Plasmodium falciparum: Interprétation du semi-micro-test de chimiosensibilité par incorporation de l'hypoxanthine radioactive. Path Bio 1984;32:463-466.

77 MAKLER MT, HINRICHS DJ. Measurement of the lactate dehydrogenase: stage-specific lactate production in synchronized culture. Exp. Parasitol 1993;54:391-6.

78 Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986.

79 WHO: Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated falciparum malaria. 2003 protocole.

80 WHO: Rapport d'une consultation de l'OMS Genève, Suisse, 3-5 décembre 2001.

81 Plowe, C. V., Djimde, A., Bouare, M., Doumbo, O. & Wellems, T. E. Pyrimethamine and proguanil resistance- conferring mutations in Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1995; 52, 565-568.

82 Sabah Ahmed Omar, Francis W. Makokha, Fat'hia Abdo Mohammed, Francis T. Kimani, Gabriel Magoma. Prevalence of Plasmodium falciparum chloroquine resistant gene markers, pfcr-76 and pfmdr1-86, eight years after cessation of chloroquine use in Mwea, Kenya. J Infect Developing Countries 2007; 1(2):195-201

83 Jonathan J. Juliano, Jesse J. Kwiek, Kathryn Cappell, Victor Mwapasa, and Steven R. Meshnick. Minority-Variant pfcr K76T Mutations and Chloroquine Resistance, Malawi. Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 13, No. 6, June 2007

84 World Health Organization. Susceptibility of Plasmodium falciparum to antimalarial drugs. Report on global monitoring: 1996-2004. Geneva: The Organization; 2005.

85 STEFFEN GROTH, BALDIP KHAN, ALAN ROBINSON ET JORGE HENDRICHES.

La science nucléaire contre le paludisme, le rôle ciblé des techniques radiologiques et moléculaires. Bulletin AIEA, 43/2/2001